
Polyphenolanalyse in gartenbaulichen Produkten auf der Basis laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum horticulrarum

(Dr. rer. hort.)

eingereicht an der

Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Janina Saskia Wulf

geb. 01.03.1975, Berlin

Präsident

der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan

der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät

Prof. Dr. Dr. h.c. Otto Kaufmann

Vorsitzender

der Prüfungskommission

Prof. Dr. Wolfgang Bokelmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Uwe Schmidt
2. PD Dr. habil. Manuela Zude

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Zielstellung	2
2	Stand des Wissens	3
2.1	Phenole	3
2.1.1	Biochemie der Phenolsynthese	3
2.1.2	Ernährungsphysiologische Wirkung	9
2.1.3	Phenole im Obst	12
2.2	Fluoreszenz	20
2.2.1	Physikalisch-chemischer Hintergrund von Fluoreszenzerscheinungen	20
2.2.2	Fluoreszenzfähigkeit	22
2.2.3	Fluoreszenzlöschung	26
2.2.4	Messtechnik	28
2.3	Chemometrie	32
2.3.1	Hauptkomponentenanalyse	32
2.3.2	Partial least squares Regression	33
2.3.3	Spezielle Vorverarbeitungsmethoden	37
3	Material und Methoden	42
3.1	Nachweismethoden	42
3.1.1	Fluoreszenzspektroskopie im <i>front-face</i> -Modus	42
3.1.2	Zeitaufgelöste laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie	43
3.1.3	Chromatographische Bestimmungsmethoden	46
3.2	Versuchsdurchführung	47
3.2.1	Vorversuche	47
3.2.2	Varianzanalyse der Fluoreszenz von Gartenbauprodukten	49
3.2.3	Reabsorptions- und Löschungseffekte	51
3.2.4	Versuchsreihen zur Kalibrierung und Validierung	55

3.3	Datenauswertung	56
4	Ergebnisse	58
4.1	Vorversuche	58
4.1.1	Gerätebedingte Einflussfaktoren	58
4.1.2	Einfluss der Umgebungsbedingungen	61
4.2	Varianzanalyse der Fluoreszenz von Gartenbauprodukten	65
4.2.1	Fluoreszenzsignal	65
4.2.2	<i>Monitoring</i> im Lager	68
4.3	Reabsorptions- und Löschungseffekte	81
4.3.1	Reinstsubstanzen	81
4.3.2	Apfelextrakte	87
4.3.3	Analyse am Produkt: Verbräunungsreaktionen	88
4.4	Vorverarbeitung und Kalibrierung	92
4.4.1	Signalvorverarbeitungsmethoden	92
4.4.2	Datenvorverarbeitungsmethoden	96
4.5	Kalibrierung und Validierung	107
4.5.1	Validierung der Kalibriermodelle	107
4.5.2	Einfluss der Reabsorptionseffekte auf die Kalibriermodelle	115
5	Diskussion	117
5.1	Varianzanalyse der Fluoreszenz von Gartenbauprodukten	117
5.1.1	Fluoreszenzsignal	117
5.1.2	<i>Monitoring</i> im Lager	119
5.1.3	Schlussfolgerung	122
5.2	Quantitative Fluoreszenzanalyse	123
5.2.1	Verbräunungsreaktionen	123
5.2.2	Kalibrierung	124
5.2.3	Validierung	128
5.2.4	Schlussfolgerungen	130

Inhaltsverzeichnis	III
<hr/>	
6 Zusammenfassung	131
Literatur	133

Abkürzungen

ADU	Analog-Digital-Umwandler
AOTF	Akusto-optisch durchstimmbare Filter (<i>acusto-optic tunable filter</i>)
AUTO _p	Autoskalierung über die Proben
AUTO _{λ}	Autoskalierung über die Wellenlängen (<i>standard normal variate</i>)
B	Koeffizienten-Matrix
CA	Lager mit kontrollierter Atmosphäre (<i>controlled atmosphere</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
CV	Kreuzvalidierung
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
DMACA	p-Dimethyl-Aminocinnamic Aldehyde
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOSC	Direkte orthogonale Signalkorrektur (<i>direct orthogonal signal correction</i>)
EG	Europäische Gemeinschaft
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I	Intensität
IR	Infraroter Bereich des Lichts
K	Summarische Konstante aller Deaktivierungsraten
KUL	Katholieke Universiteit Leuven
LIFS	Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie
LV	Latente Variable(n)
m _p	Mittelwert über die Proben
m _{λ}	Mittelwert über die Wellenlängen
MZ _p	Mittelwertzentrierung über die Proben
MZ _{λ}	Mittelwertzentrierung über die Variablen (Wellenlängen)
NADPH	Reduzierte Form von Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NIR	Nahinfraroter Bereich des Lichts

O ₂	Sauerstoff
OSC	Orthogonale Signalkorrektur (<i>orthogonal signal correction</i>)
P	<i>Loading</i> -Matrix
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PC	Hauptkomponente(n) (<i>principal component(s)</i>)
PCR	Hauptkomponentenregression (<i>principal component regression</i>)
PLS	<i>Partial least squares</i> Regressionsanalyse
PMT	Photomultiplier
PPO	Polyphenoloxidasen
R ²	Bestimmtheitsmaß
rmsec	Fehler in der Kalibrierung (<i>root mean squares error of calibration</i>)
remsep	Fehler in der Validierung (<i>root mean squares error of prediction</i>)
rmsecv	Fehler in der Kreuzvalidierung (<i>root mean squares error of cross validation</i>)
S ₀ , S ₁ , S _n	Singulettzustände
s _p	Standardabweichung über die Proben
s _λ	Standardabweichung über die Wellenlängen
T ₀ , T ₁ , T _n	Triplettzustände
T	<i>Scores</i> -Matrix
UV	Ultravioletter Bereich des Lichts
VIS	Sichtbarer Bereich des Lichtes (<i>visible</i>)
W	<i>Loading Weights</i> -Matrix
X _{n*m}	Matrix X
n:	Anzahl der Reihen (Proben)
m:	Anzahl der Spalten (Wellenlängen)
y	Vektor y
y	gemessener y-Wert
y _{pred}	Vorhergesagter y-Wert

y_{test}	Gemessener y-Wert eines unabhängigen Datensatzes (<i>Test-Set</i>)
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
τ	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.1: Phenol.....	3
Abb. 2.1.2: Die Biosynthese der Polyphenole (PAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase).....	5
Abb. 2.1.3: Strukturformel der Chlorogensäure.....	13
Abb. 2.1.4: Strukturformel der Ellagsäure.....	13
Abb. 2.1.5: Strukturformel von Cyanidin.....	14
Abb. 2.1.6: Strukturformel von Quercetin.....	15
Abb. 2.1.7: Strukturformel von Phloretin.....	15
Abb. 2.1.8: Strukturformel der Catechine.....	16
Abb. 2.1.9: Strukturformel der Procyanidine.....	16
Abb. 2.2.1: Jablonski-Diagramm.....	20
Abb. 2.2.2: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (---) von Photosystem II aus Weizenchloroplasten (nach GASANOV et al. zit. in HÄDER, 2002).....	22
Abb. 2.3.1: Abhängigkeit des Fehlers von der Komplexität des Kalibrierfaktors (FROST, 2000).....	35
Abb. 2.3.2: Der Kalibrierungs- und Validierungszyklus (vgl. BÜNTING, 1999).....	36
Abb. 4.1.1: Mittelwert und Standardabweichung ($n = 15$) der Fluoreszenzspektren eines Rubin-Kristalls und des Spektralons. Die Standards wurden mit unterschiedlicher Empfindlichkeit des Detektors gemessen.....	58
Abb. 4.1.2: Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzspektren ($n = 15$) gemessen an in destilliertem Wasser gelösten Riboflavin.....	59
Abb. 4.1.3: Korrektur des Fluoreszenzspektrums mit Hilfe der Laserenergievariation am Beispiel der Erdbeere.....	60
Abb. 4.1.4: Einfluss des Abstands der Sonde von der Probenoberfläche auf die Fluoreszenzintensität. ...	61
Abb. 4.1.6: Einfluss der Temperatur des Apfelfruchtfleisches auf die Fluoreszenzintensität.....	62
Abb. 4.1.7: Einfluss des pH -Wertes auf das Fluoreszenzsignal von Phenolsäuren.....	63
Abb. 4.1.5: Einfluss mehrfacher laser-induzierter Fluoreszenzmessung auf die Fluoreszenzintensität (gemessen an der grünen Fruchtschale des Apfels).....	64
Abb. 4.2.1: Fluoreszenzspektren gemessen mit Hilfe der laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie an Apfel, Möhre und Erdbeere.....	65

Abb. 4.2.2: Absorptions- (A) und Fluoreszenzspektren (F) von Chlorophylle, β -Carotin und Malvidin (gelöst in Ether).....	66
Abb. 4.2.3: Absorptions- (A) und Fluoreszenzspektren (F) von phenolischen Reinstsubstanzen gelöst in Methanol.	67
Abb. 4.2.4: 2. Ableitung und geglättete Fluoreszenzspektren gemessen mit Hilfe der laser-induzierten Fluoreszenzanalyse an Apfel, Möhre und Erdbeere.	67
Abb. 4.2.5: Apfelfluoreszenzspektren angeregt mit monochromatischer Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge.....	68
Abb. 4.2.6: <i>Scores</i> der Rohdaten mit 488 nm angeregter Fluoreszenzspektren von Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger CA-Lagerung.	69
Abb. 4.2.7: <i>Scores</i> der Hauptkomponentenanalyse von der ersten Ableitung der Rohdaten mit 488 nm ..	70
Abb. 4.2.8 <i>Scores</i> der zweiten Ableitung der Rohdaten mit 488 nm angeregter Fluoreszenzspektren an den Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger CA-Lagerung.....	71
Abb. 4.2.9: <i>Scores</i> nach MZ_p der Rohdaten der mit 488 nm angeregt Fluoreszenzspektren an den Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger CA-Lagerung.....	72
Abb. 4.2.10: <i>Loadings</i> der ersten zwei PC nach MZ_p mit und ohne vorheriger Glättung der Originalspektren.....	73
Abb. 4.2.11: <i>Loadings</i> der ersten zwei PC nach MZ_p nach Glättung und Mittelwerte der geglätteten Apfelfluoreszenzspektren gemessen vor (Einlagerung) und nach der CA-Lagerung (Auslagerung).	74
Abb. 4.2.12: <i>Scores</i> nach MZ_p der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Apfelfluoreszenzspektren vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger CA-Lagerung.....	75
Abb. 4.2.13: <i>Loadings</i> der ersten zwei PC nach MZ_p der Rohdaten und Mittelwerte der mit 337 nm angeregten und geglätteten Apfelfluoreszenzspektren gemessen vor (Einlagerung) und nach der CA-Lagerung (Auslagerung).	76
Abb. 4.2.14: <i>Scores</i> nach MZ_p der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Apfelfluoreszenzspektren auf der grünen Seite vor (Δ), nach zweimonatiger (\blacktriangle) und nach viermonatiger Kühllagerung (*).	77
Abb. 4.2.15: <i>Scores</i> nach MZ_p der Rohdaten mit 337 nm angeregter Apfelfluoreszenzspektren auf der roten Seite vor (Δ), nach zweimonatiger (\blacktriangle) und nach viermonatiger Kühllagerung (*).	78
Abb. 4.2.16: <i>Loadings</i> der ersten zwei PC nach MZ_p der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Fluoreszenzspektren der Sonnen- und der Schattenseite kühlgelagerter Äpfel.....	78
Abb. 4.2.18: <i>Loadings</i> der ersten zwei PC nach MZ_p der Rohdaten mit 337 nm angeregter Fluoreszenz bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerter Möhren und Mittelwerte der Möhrenfluoreszenzspektren vor (*) und nach vierwöchiger Lagerung bei 0°C (\square), 4°C (\blacktriangle) und Raumtemperatur (\circ).	80

Abb. 4.3.1: Einfluss der Konzentration auf die Intensität der Fluoreszenzemission, gemessen bei maximaler Fluoreszenzemission und einer Empfindlichkeit von 400 Volt (Catechine) bzw. 500 Volt (Hydroxyzimtsäuren).	82
Abb. 4.3.2: Einfluss der Zugabe von Hydroxyzimtsäuren unterschiedlicher Konzentration zu 0,05 mg/mL konzentriertem Catechin in Lösung (Methanol) auf die Intensität der Fluoreszenzanregung gemessen bei einer Emissionswellenlänge von 310 nm.	83
Abb. 4.3.3: Einfluss der Zugabe von Hydroxyzimtsäuren unterschiedlicher Konzentration zu Catechin in Lösung (Methanol) auf die Intensität der Fluoreszenzemission gemessen bei der maximalen Intensität bei 310 nm	84
Abb. 4.3.4: Einfluss der Zugabe von Catechin unterschiedlicher Konzentration zu Kaffeesäure in Lösung (Methanol) auf die Intensität der Fluoreszenzemission gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm.	85
Abb. 4.3.5: Fluoreszenzemissionsspektren von 0,05 mg/mL konzentrierter Chlorogensäure-Lösung mit und ohne Zusatz von 0,05 mg/mL konzentrierter Phloridzin- oder Rutin-Lösung gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm.	86
Abb. 4.3.6: Fluoreszenzemission (angeregt bei 364 nm) von polaren Apfelextrakten mit und ohne Zusatz von 0,05 mg/mL konzentrierter Phloridzin- bzw. Rutin-Lösung.....	88
Abb. 4.3.7: Fluoreszenzspektren gemessen am Apfelfruchtfleisch direkt nach dem Schneiden (0 Minuten) und im Verlauf einer Stunde (60 Minuten).	89
Abb. 4.3.8: Reflexionsspektren gemessen am Apfelfruchtfleisch direkt nach dem Schneiden (0 Minuten) und im Verlauf einer Stunde (60 Minuten).	89
Abb. 4.3.9: Mit Hilfe der Reflexionsspektren korrigierte Fluoreszenzemissionsspektren (Emission/Reflexion) gemessen am Apfelfruchtfleisch direkt nach dem Schneiden (0 Minuten) und im Verlauf einer Stunde (60 Minuten).	90
Abb. 4.4.1: Kalibrierung auf mittels Autoskalierung über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Apfelfluoreszenzspektren und des Gehalts des Hydroxyzimtsäurederivat [mg/g Frischgewicht]. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,40$ und $b = 0,40$; $r_c^2 = 0,401$	93
Abb. 4.4.2: Kalibrierung auf mittels Mittelwertzentrierung (grau ---) (Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,66$ und $b = 0,06$; $r_c^2 = 0,658$) und Autoskalierung (weiß —) (Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,50$ und $b = 0,08$; $r_c^2 = 0,503$) über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren und des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose [mg/g Trockengewicht].	94
Abb. 4.4.3: <i>Loadings</i> der Kalibrierung auf mittels Autoskalierung über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Apfelfluoreszenzspektren und des Gehalts an Hydroxyzimtsäurederivat und Fluoreszenzspektren von in Methanol gelösten Phenolstandards (1 mg/mL).	95
Abb. 4.4.4: <i>Loadings</i> der Kalibrierung auf mittels Autoskalierung über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren und des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose.	96

Abb. 4.4.5: Kalibrierung auf mittels Autoskalierung vorverarbeiteten Apfelfluoreszenzspektren und nach Datenvorverarbeitung mit Hilfe genetischer Algorithmen. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,53$ und $b = 0,032$; $r_c^2 = 0,528$.	98
Abb. 4.4.6: <i>PCA</i> der Fluoreszenzspektren gemessenen auf der grünen (▲) und der roten (○) Seite der Äpfel.	100
Abb. 4.4.7: Fluoreszenzspektren von der roten (grau) und grünen (schwarz) Seite der Äpfel.	101
Abb. 4.4.8: Fluoreszenzspektren von der roten (grau) und grünen (schwarz) Seite der Äpfeln nach Entfernung von zwei <i>DOSC</i> -Faktoren mit für den Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats nicht relevanten Informationen aus der spektralen Datenmatrix.	101
Abb. 4.4.9: Kalibrierung auf mittels direkter orthogonaler Signalkorrektur (<i>DOSC</i>) und Mittelwertzentrierung vorverarbeiteten Rohdaten der Apfelfluoreszenzspektren. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 1,00$ und $b = 0,00$; $r_c^2 = 0,999$.	103
Abb. 4.4.10: Fluoreszenzspektren gemessen an Erdbeeren der Reifestufe 1 (grau—), Reifestufe 2 (schwarz—) und Reifestufe 3 (grau---).	104
Abb. 4.4.11: Fluoreszenzspektren gemessen an gemessen an Erdbeeren der Reifestufe 1 (grau—), Reifestufe 2 (schwarz—) und Reifestufe 3 (grau---) nach Entfernung von zwei <i>DOSC</i> -Faktoren mit für den Gehalt der p-Cumaroyl-Glucose nicht relevanten Informationen aus der spektralen Datenmatrix.	105
Abb. 4.4.12: Kalibrierung auf mittels direkter orthogonaler Signalkorrektur (<i>DOSC</i>) und Mittelwertzentrierung vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 1,00$ und $b = 0,00$; $r_c^2 = 1,000$.	106
Abb. 4.5.1: Kalibrierung (weiß) und Test-Set (grau) auf mittels direkter orthogonaler Signalkorrektur (<i>DOSC</i>) und Autoskalierung vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a_c = 0,98$, $a_v = 1,39$ und $b_c = 0,00$, $b_v = 0,01$; $r_c^2 = 0,983$ und $r_v^2 = 0,980$.	115

Tabellenverzeichnis

Tab 2.1.1: Absorptionsmaxima phenolischer Substanzen (FEUCHT und TREUTTER, 1989).	4
Tab. 2.1.2: Gehalt an Polyphenolen in Apfelfrüchten gemessen an verschiedener Sorten (FG: Frischgewicht, TG: Trockengewicht).....	17
Tab. 2.1.3: Gehalt an Polyphenolen in Erdbeerfrüchten gemessen an unterschiedlichen Sorten in Anlehnung an HERRMANN (2001) und ergänzt (FG: Frischgewicht, TG: Trockengewicht).	19
Tab. 3.1.1: Einstellungsbereiche der Parameter des Fluoreszenzspektrometers im ‚front-face‘-Modus für die Messung der Fluoreszenz- und Reflexionsspektren.	43
Tab. 3.1.2: Einstellungsbereiche der Parameter des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	45
Tab. 3.2.1: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	48
Tab. 3.2.2: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	48
Tab. 3.2.3: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	49
Tab. 3.2.4: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	49
Tab. 3.2.5: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	50
Tab. 3.2.6: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	50
Tab. 3.2.7: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.	51
Tab. 3.2.8: Einstellungen für die Detektion der Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.....	52
Tab. 3.2.9: Mischungen mit jeweils 1 mL der Phenolstandardlösungen aufgefüllt auf 10 mL mit Methanol. Die mit x gekennzeichneten Zusammensetzungen wurden hergestellt (Cat: Catechin, Chl: Chlorogensäure, Kaf: Kaffeesäure).	52
Tab. 3.2.10: Einstellungen für die Detektion der Anregungs- und Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.....	53
Tab. 3.2.11: Mischungen mit jeweils 1 mL der Phenolstandardlösungen aufgefüllt auf 10 mL mit Methanol.	53
Tab. 3.2.12: Einstellungen für die Detektion der Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.....	54
Tab. 3.2.13: Einstellungen für die Detektion der Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.....	54
Tab. 3.2.14: Einstellungen für die Detektion der Anregungs- und Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.....	55

Tab. 3.2.15: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.....	55
Tab. 3.2.16: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.....	56
Tab. 4.2.1: Standardabweichungen der <i>Scores</i> der Hauptkomponentenanalyse der Fluoreszenzspektren gemessen auf der grünen und der roten Seite der Äpfel.....	77
Tab. 4.3.1 Maximale Fluoreszenzemission von in Äpfeln und Erdbeeren enthaltenen Polyphenolverbindungen und Ascorbinsäure	81
Tab. 4.3.2: Relative Fluoreszenzintensität der Emission [%] von Catechin (Cat) (gemessen bei 310 nm) mit und ohne Zugabe verschiedener Konzentrationen von Kaffee- (Kaf) bzw. Chlorogensäure (Chl).....	84
Tab. 4.3.3: Integrale der Fluoreszenzintensität [%] der polaren Apfelextrakte im blau-grünen (400-500 nm) und roten (650-700 nm) Wellenlängenbereich mit und ohne Zugabe von Phloridzin bzw. Rutin.	87
Tab. 4.3.4: Integrale der korrigierten Fluoreszenzspektren der Verbräunungsmessung am Apfelfruchtgewebe.....	91
Tab. 4.4.1 Bestimmtheitsmaß (r_c^2), Kalibrierfehler (<i>rmsec</i>) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler (<i>rmsecv</i>) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (PLS) Regressionsanalyse mit zwei latenten Variablen ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats in Äpfeln.....	93
Tab. 4.4.2: Bestimmtheitsmaß (r_c^2), Kalibrierfehler (<i>rmsec</i>) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler (<i>rmsecv</i>) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (PLS) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle mit zwei latenten Variablen für den Gehalt an Hydroxyzimtsäurederivat in Äpfeln in ausgewählten Wellenlängenbereichen.....	97
Tab. 4.4.3: Die mittels genetischer Algorithmen ausgewählten Wellenlängen bzw. Wellenlängenbereiche nach unterschiedlicher Signalvorverarbeitung für die Kalibrierung auf ein Hydroxyzimtsäurederivat bei Äpfeln.....	97
Tab. 4.4.4: Anzahl latenter Variablen (<i>LV</i>), Bestimmtheitsmaß (r_c^2) und Kalibrierfehler (<i>rmsec</i>) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler (<i>rmsecv</i>) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (PLS) Regressionsanalyse (mit autoskalierter <i>X</i> -Matrix) ermittelten Kalibriermodelle für die Apfelfluoreszenzspektren. Zur Wellenlängenselektion wurden genetische Algorithmen ohne und mit vorheriger Signalvorverarbeitung der Spektren eingesetzt.....	98
Tab. 4.4.5: Die mittels genetischer Algorithmen ausgewählten Wellenlängenbereiche nach unterschiedlicher Signalvorverarbeitung für die Kalibrierung auf die p-Cumaroyl-Glucose bei Erdbeeren.	99
Tab. 4.4.6: Statistische Angaben zum Gehalt an Hydroxyzimtsäure [mg/g Frischgewicht] gemessen auf der Sonnen- und der Schattenseite der Äpfel.	100
Tab. 4.4.7: Anzahl latenter Variablen (<i>LV</i>), Bestimmtheitsmaß (r_c^2) und Kalibrierfehler (<i>rmsec</i>) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler (<i>rmsecv</i>) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (PLS)	

Regressionsanalyse (mit autoskalierter <i>X</i> -Matrix) ermittelten Kalibriermodelle für die mit der direkten orthogonalen Signalkorrektur (<i>DOSC</i>) vorverarbeiteten Apfelfluoreszenzspektren.	102
Tab. 4.4.8: Statistische Angaben zum Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose [mg/g Trockengewicht] in Erdbeeren verschiedener Reifestufen.	103
Tab. 4.4.9: Die mit Hilfe der Methode der genetischen Algorithmen ausgewählten Wellenlängenbereiche für auf zwei <i>DOSC</i> -Faktoren reduzierte Apfel- und Erdbeerfluoreszenzspektren.	106
Tab. 4.5.1: Statistische Angaben zum Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose [mg/g Trockengewicht] in Erdbeeren verschiedener Reifestufen des Kalibrier- sowie des <i>Test-Set</i> -Datensatzes.	108
Tab. 4.5.2 Anzahl latenter Variablen (<i>LV</i>) und Bestimmtheitsmaße der Kalibrierung (r_c^2) sowie der Validierung (r_v^2) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (<i>PLS</i>) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der Fruchtfluoreszenzspektren mit bzw. ohne direkte orthogonale Signalkorrektur (<i>DOSC</i>).	109
Tab. 4.5.3 Anzahl latenter Variablen (<i>LV</i>), Kalibrierfehler (<i>rmsec</i>), Fehler in der Kreuzvalidierung (<i>rmsecv</i>) sowie in der Validierung (<i>rmsep</i>) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (<i>PLS</i>) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der Fruchtfluoreszenzspektren mit bzw. ohne direkte orthogonale Signalkorrektur (<i>DOSC</i>)...	111
Tab. 4.5.4 Anzahl latenter Variablen (<i>LV</i>) und Bestimmtheitsmaße der Kalibrierung (r_c^2) sowie der Validierung (r_v^2) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (<i>PLS</i>) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der mit Hilfe der Reflexionsspektren korrigierten Fruchtfluoreszenzspektren und direkter orthogonaler Signalkorrektur (<i>DOSC</i>).....	116
Tab. 4.5.5 Anzahl latenter Variablen (<i>LV</i>), Kalibrierfehler (<i>rmsec</i>), Fehler in der Kreuzvalidierung (<i>rmsecv</i>) sowie in der Validierung (<i>rmsep</i>) der mit Hilfe von <i>partial least squares</i> (<i>PLS</i>) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der mit Hilfe der mittelwertzentrierten Reflexionsspektren korrigierten mittelwertzentrierten Fruchtfluoreszenzspektren und direkter orthogonaler Signalkorrektur (<i>DOSC</i>).	116

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Bedingt durch eine stetig anwachsende Unsicherheit auf Seiten der Konsumenten, gewinnt die Nachfrage nach gesteigerten Qualitätskontrollen und einem effektiven Qualitätsmanagement im Umgang mit der Produktion und Verarbeitung gartenbaulicher Produkte an Bedeutung. Orientierte sich das Verbraucherverhalten vor Jahren noch ausschließlich an den *EG*-Normen und anderen Gütesiegeln, die ausschließlich äußere Merkmale berücksichtigten, so findet in letzter Zeit in zunehmendem Maße ein Umdenken in Richtung ernährungsphysiologischer Qualität statt. Dies lässt sich nicht nur ausschließlich durch die zunehmend belastenden Umweltbedingungen erklären, die in den Medien beispielsweise Diskussionen über oxidativen Stress durch *UV*-Strahlung und Rückstände in Nahrungsmitteln aufwerfen. Sowohl durch das gesteigerte Gesundheitsbewusstsein der Verbraucher als auch durch ein insgesamt größeres Interesse an gesunder Ernährung wurden gesellschaftlich geförderte Aktionen ins Leben gerufen („5 am Tag“ (<http://www.5amtag.de>) „Leichter Leben in Deutschland“ (<http://www.llid.de>), die vor allem die gesundheitsfördernde Wirkung von Obst- und Gemüseprodukten in den Vordergrund stellen. Der gesundheitliche Wert dieser Produkte liegt dabei vor allem in dem pflanzenphysiologischen Zusammenwirken der Inhaltsstoffe, die Vitamin- oder Mineralstoffpräparate, die auf zumeist chemisch hergestellten Einzelsubstanzen beruhen, sind hingegen lediglich nur als Ergänzung geeignet. In diesem Zusammenhang gewinnen die sekundären Pflanzenstoffe (z.B. Phenole, Vitamine) immer mehr an Bedeutung, da ihnen durch klinische Studien belegte anti-cancerogene Wirkungen und positive Wirkungen auf koronare Herzerkrankungen nachgesagt werden (HERTOG et al., 1993; KNEKT et al., 1997; LIU, 2000; EBERHARDT et al., 2002; DA SILVA PORTO et al., 2003; BOYER und LIU, 2004). Im Hinblick auf die Qualität im Prozessmanagement von Obst- und Gemüseprodukten besteht demzufolge ein gesteigerter Bedarf an Kontrollen, um der schnelleren Verderblichkeit der Produkte, dem verarbeitungsbedingten Ab- und Umbau wertgebender Inhaltsstoffe und der Unsicherheit der Verbraucher entgegen wirken zu können.

Die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Reifestufen, der ernährungs-physiologischen Qualität und den charakteristischen Veränderungen der Gehaltsmengen und Zusammensetzung von Pigmenten in Obst- und Gemüse (Chlorophylle, Carotinoide, Polyphenole) wurden bereits im Zuge vielfältiger Untersuchungen zu Lagerung und Nachernte ermittelt (SIMON, 1997; KNEE, 1988; ABBOTT, 1999; ZUDE et al., 2002). Derartige Veränderungen der Inhaltsstoffe können als Indikatoren für Produktqualität dienen, bevor die eintretenden Alterungs- und Verderbnisprozesse von außen sichtbar werden. Die bislang im Prozessmanagement eingesetzten Messverfahren sind vorwiegend zerstörend und lassen somit keine Langzeituntersuchungen der einzelnen Produkte entlang der Vermarktungskette zu. Optische Methoden bieten die Möglichkeit, qualitative und quantitative Veränderungen von Inhaltsstoffen einzelner Obst oder Gemüseprodukte schnell und zerstörungsfrei zu untersuchen. Die Spektroskopie wurde bereits erfolgreich zur Analyse der Fruchtqualität eingesetzt (KAWANO et al., 1990, 1992; PEIRS et al., 2000; LAMMERTYN et al., 2000; ZUDE, 2003; SARANWONG et al., 2004). Das Potential der Fluoreszenzspektroskopie wurde jedoch bislang nicht systematisch erarbeitet. Der Schwerpunkt der Nutzung von Fluoreszenzanalysen lag

vorwiegend auf Untersuchungen zur Kinetik der Chlorophyllfluoreszenz, messbar im roten Wellenlängenbereich des Fluoreszenzspektrums (KAUTSKY und HIRSCH, 1931; BUSCHMANN und GRUMBACH, 1985; VON WILLERT et al., 1995). Erst vor kurzem wurden Systeme der Fluoreszenzspektroskopie zur Ermittlung von Veränderungen von Substanzen, die im blau-grünen Wellenlängenbereich fluoreszierenden, erprobt (MORALES et al., 1994; BUSCHMANN et al., 2000; KIM et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2002; ZUDE, 2004), um mögliche Einsatzgebiete in der Industrie wissenschaftlich darzulegen. In der vorliegenden Arbeit soll die zerstörungsfreie Bestimmung wertgebender Inhaltsstoffe mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie am Beispiel von Polyphenolen in Früchten untersucht werden.

1.2 Zielstellung

Die zerstörungsfreie Fluoreszenzmessung sollte eingesetzt werden, um Inhaltsstoffe in Gartenbauprodukten objektiv und schnell bestimmen zu können. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Ansatz am Beispiel von Polyphenolen in Früchten untersucht werden. Damit sollte ein Beitrag zur strategischen Vermeidung von Qualitätseinbußen insbesondere in der Nachernte- und Verarbeitungstechnologie geleistet werden. Im Hinblick auf den Gesundheitsnutzen könnte ein höherer Nährwert der Gartenbauprodukte durch schonende und somit gute Inhaltsstoffe erhaltende Prozessoptimierung erreicht werden.

Die zerstörungsfreie Fluoreszenzmessung wurde zunächst für eine Varianzanalyse der stoffwechselphysiologisch bedingten Veränderungen der Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse im Nachernte- und Verarbeitungsprozess eingesetzt. Hierfür wurden Versuche an ganzen Früchten während der Lagerung durchgeführt. Mit Hilfe von Reinsubstanzen wurden die Wechselwirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe eingehender untersucht und ausgewertet, um die Fluoreszenzemission beeinträchtigende Reabsorptions- und Löschungseffekte einzuordnen. Durch den Einsatz von nass-chemischen Analysen, insbesondere Analysen mit der Hochdrucks-Flüssigkeitschromatographie (*HPLC*), zur Bestimmung der Inhaltsstoffgehalte und chemometrischer Auswerteverfahren wurde unter Zuhilfenahme von verschiedenen Signal- und Datenvorverarbeitungsmethoden Kalibrierungen erarbeitet und unter Berücksichtigung der in der Praxis auftretenden Variabilität validiert.

2 Stand des Wissens

2.1 Phenole

FrISCHE Obst- und Gemüseprodukte sind wichtige Energielieferanten durch ihre primär gebildeten Pflanzenstoffe (Fett, Kohlenhydrate, Eiweiße und Nukleinsäuren), die die Inhaltsstoffe jeder Zelle darstellen. Darüber hinaus gibt es auch eine Reihe sekundärer Pflanzenstoffe, die nur in bestimmten Pflanzengeweben vorkommen, und die erst in den letzten Jahren insbesondere auf ihre gesundheitsfördernden Eigenschaften für den menschlichen Organismus eingehender untersucht wurden. Die größte Gruppe innerhalb dieser Sekundärstoffe stellen die Phenole bzw. Polyphenole dar. In Pflanzen dienen sie vor allem als Schutzfaktor vor Mikroorganismen, Insektenfraß sowie abiotische Stressfaktoren (z.B. starke *UV*-Strahlen, Ozon) und in vielen Obstarten tragen sie zudem zu Geschmack, Duft und Aussehen bei.

2.1.1 Biochemie der Phenolsynthese

Die chemische Struktur aller phenolischen Verbindungen baut auf ihrem einfachsten und kleinsten Vertreter, dem Phenol (Abb. 2.1.1) auf, nach dem die gesamte Stoffgruppe benannt wurde. Phenole sind Verbindungen, die eine oder mehrere Hydroxylgruppen (*OH*-Gruppen) oder daraus entstandene Derivate enthalten, welche an einen aromatischen Ring bzw. einen Benzolkern gebunden sind.

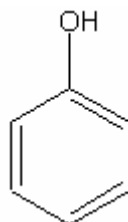


Abb. 2.1.1: Phenol.

Für das Phenol können mesomere Grenzstrukturen formuliert werden. Dabei treten die delokalisierten π -Elektronen des Ringes in Wechselwirkung mit den nichtbindenden Elektronenpaaren des Sauerstoffs. Das erweiterte π -Elektronensystem kann mit geringerer Energie angeregt werden, als das klassische π -Elektronensystem des zugrunde liegenden aromatischen Kohlenwasserstoffs. Dementsprechend absorbieren Phenole längerwellige *UV*-Strahlung (Tab. 2.1.1).

Tab 2.1.1: Absorptionsmaxima phenolischer Substanzen (FEUCHT und TREUTTER, 1989).

Phenol-Gruppe	Absorptionsmaximum (nm)
Isoflavone	250-275
Flavanole	~280
Flavanone	270-290
Dihydroflavanole	270-290
Stilbene	~300
Hydroxyzimtsäuren	290-330
Cumarine	310-350
Flavone	320-350
Flavonole	340-380
Chalkone	340-390
Benzochinone	260-280, 375-410
Naphtochinone	330-340, ~400
Anthrachinone	330-340, 400-530
Aurone	380-430
Anthocyanidine	480-560

Aufgrund der durch die mesomeren Strukturen geförderten Dissoziierbarkeit ihrer *OH*-Gruppe reagieren Phenole sauer. Der chemische Aufbau der Polyphenole weist hingegen mehr als nur einen aromatischen Ring auf. Sie liegen in der Pflanze oftmals als Glykoside, also mit Zucker verbunden, vor, besonders wenn sie in der Vakuole der Zelle gelöst sind, und reagieren schnell mit anderen Verbindungen.

Nach FEUCHT und TREUTTER (1989) werden die wichtigsten Grundstrukturen phenolischer Substanzen in Pflanzen wie folgt eingeteilt:

- Grundverbindungen (z.B. Cumarin, Stilben, Pterocarpan, Auron, Benzochinon, Naphtochinon, Anthrachinon),
- phenolische Säuren, bei denen zwischen Hydroxyzimtsäuren und Benzoessäuren unterschieden wird

- und Flavonoide, die die größte Bedeutung unter den Polyphenolen in Pflanzen haben (Proanthocyanidine, Anthocyanidine, Flavone, Flavonole, Flavanone, Dihydrochalkone, Flavan-3-ole (Catechine) und Isoflavonoide).

Die Grundgerüste der Phenole können dabei bspw. durch die Substitution von *H*-Atomen durch *OH*-Gruppen verändert werden. Diese Hydroxylgruppen können wiederum methyliert, acyliert oder glycosidiert sein. Durch Kondensation von mehreren Monomeren können Polymere gebildet werden (z.B. das Lignin bei Flavanolen) oder es entstehen Verbindungen einzelner Phenole durch Zucker oder durch nicht-aromatische, aliphatische Säuren.

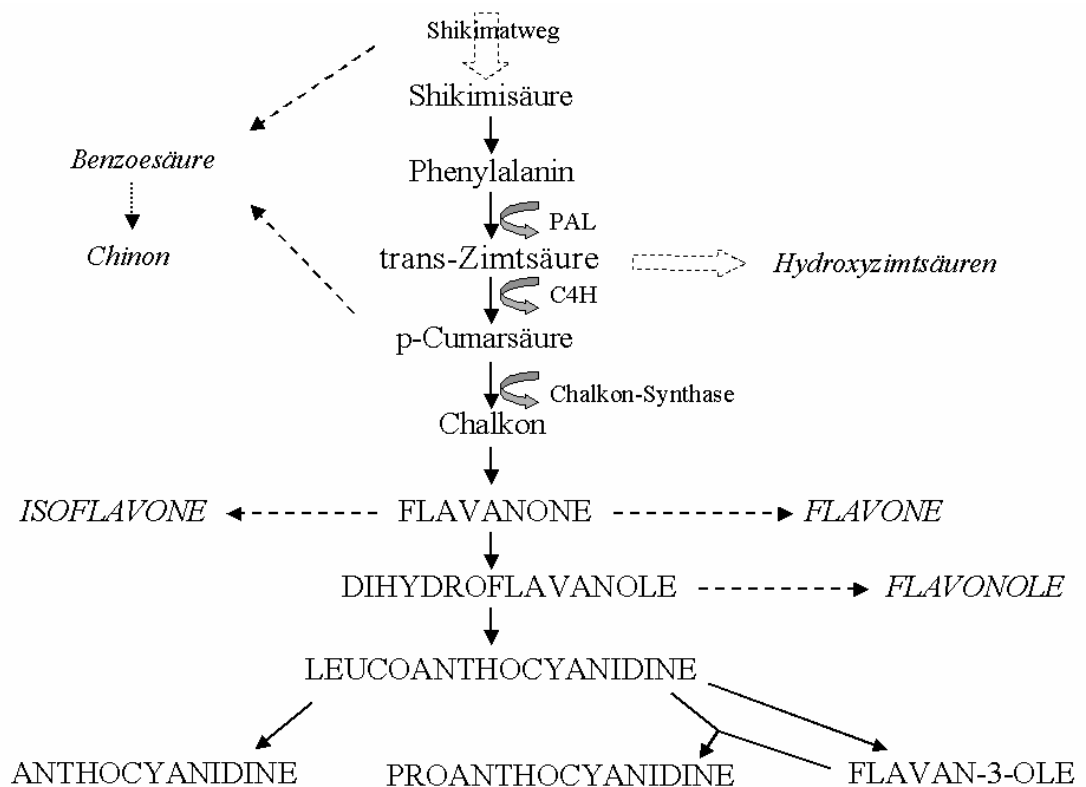


Abb. 2.1.2: Die Biosynthese der Polyphenole (PAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase).

Die Biosynthese der Polyphenole (Abb. 2.1.2) bezieht ihre Edukte (Vorstufen) aus dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Die enzymatische Synthese der Vorstufen Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat führt über die Zwischenstufen 3-Desoxyarabinoheptulose-6-Phosphat, Dehydrochinasäure und Dehydroshikimisäure zur Shikimisäure, welche die Ausgangskomponente für die meisten phenolischen Substanzen darstellt (RECHNER, 2000). Über den Shikimat-Weg (WOLLGAST und ANKLAM, 2000) wird die Aminosäure Phenylalanin gebildet, aber auch Tyrosin wird als Vorstufe für die Phenol-Biosynthese diskutiert (RYAN et al., 2002), da Tyrosin über oxidative Deaminierung direkt zu p-Cumarsäure reagieren

kann. Aus Phenylalanin entsteht durch die Katalyse von Phenylalanin-Ammonium-Lyase (*PAL*) eine trans-Zimtsäure, die am Anfang des eigentlichen Phenol-Metabolismus steht (FEUCHT und TREUTTER, 1989; JU et al., 1995). Von dieser Zimtsäure leiten sich zahlreiche Derivate ab, die sogenannten Zimtsäuren, die durch Hydroxylierung, auch in Verbindung mit Methylierung der *OH*-Gruppe, gebildet werden. Diese Hydroxyzimtsäuren sind die Vorstufen für die meisten höhermolekularen Phenole (z.B. Cumarine, Flavonoide, Stilbene, Lignane, Lignine), sie stellen den einfachsten und in Pflanzen bevorzugten Weg zur Bildung von Phenolkörpern da. Über die Hydroxyzimtsäuren oder direkt durch Intermediate (Benzoessäure) des Shikimatweges werden die Chinone gebildet. Da über die Shikimat-Reaktionen neben der Zimtsäure auch die aromatischen Aminosäuren, die dem Primärstoffwechsel zugeschrieben werden, entstehen (RICHTER, 1997), befindet sich an dieser Stelle, mit der weiteren Biosynthese der Zimtsäure, der Übergang in den sekundären Stoffwechsel.

Der *PAL* wird eine Schlüsselfunktion im Phenolstoffwechsel zugeschrieben, da sie an der Abzweigung zwischen Phenol- und Aminosäuresyntheseweg liegt und daher durch zahlreiche physikalische und chemische Faktoren, z.B. *UV*-Licht und Ethylen, reguliert wird. Nach enzymatischer Hydroxylierung mit Zimtsäure-4-Hydroxylase (*C4H*) wird aus der Zimtsäure p-Cumarsäure (Hydroxyzimtsäure) gebildet. Die Hydroxyzimtsäure, die sich durch die Verbindung mit dem Coenzym-*A* (z.B. p-Coumarsäure-*CoA*) im aktiviertem Zustand befindet, reagiert weiter zu dem jeweiligen Chalkon (z.B. Naringenchalkon) durch eine von der Chalkon-Synthase katalysierten Reaktion mit drei Molekülen Malonyl-*CoA*. Aus diesem Chalkon leiten sich alle Flavonoide ab; bspw. entsteht nach Ringschluss das Flavanon Naringenin, aus dem sich die Isoflavone, die Flavone und die Dihydroflavone entwickeln können. Aus letzteren können durch weitere Synthese Flavonole gebildet werden, aber auch Leucoanthocyanidine (Flavan-3,4-diole), welche eine kurzlebige Vorstufe der Anthocyanidine, der Flavan-3-ole und deren Kondensationsprodukten, den Proanthocyanidinen, darstellen. Die Glycosyl- und Methyltransferasen sind die verantwortlichen Enzyme für die sekundären Veränderungen der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonoide und transferieren Zucker- oder Methyl-Gruppen auf die phenolischen *OH*-Gruppen. Sie sind sowohl substrat- als auch positionsspezifisch.

Als Ort der Phenol-Biosynthese kommen die Plastiden (z.B. Chloroplasten), die Membran der Vakuolen, das endoplasmatische Reticulum, aber auch die Zellwand oder das Cytosol in Frage. Die entsprechenden katalysierenden Enzyme wurden sowohl gelöst als auch membrangebunden im Plasma gefunden (FEUCHT und TREUTTER, 1989). Der Shikimatweg insbesondere spielt sich in höheren Pflanzen in der Regel in den Chloroplasten ab. Dennoch gibt es im Cytoplasma eine zweite Möglichkeit für die Synthese des Shikimats. Im nicht-grünen Zellgewebe können bereits Leukoplasten als Syntheseort fungieren (RICHTER, 1997). Die Phenolbildung kann dabei ohne Intermediärprodukte mit Hilfe von Multienzymkomplexen erfolgen oder aus einem durch Intermediärprodukte angereicherten Pool von Hydroxyzimtsäure-Glukosen gespeist werden. Anabolismus und Katabolismus der Polyphenole sind reversibel.

Phenolische Substanzen, mit Ausnahme der Gruppe der Flavanoide, kommen in Pflanzengewebe in der Regel gekoppelt an andere Moleküle und nicht in freier Form vor. Die Kopplungen entstehen hierbei meist mit Glucose-Resten, sind aber auch mit Sulfat- oder Acetyl-Resten möglich. Im glykosidierten Zustand sind die Phenole für die Zellen weniger toxisch. Die Glykosidierung der entsprechenden Aglycone findet außerhalb der Vakuole statt, die durch den Tonoplasten in die Vakuole gelangen. Dort sind weitergehende Reaktionen möglich.

Die Pflanze besteht aus differenzierten Organen (z.B. Blätter, Früchte) mit typischer Anatomie und Morphologie. Diese Gewebe besitzen einen charakteristischen Pool von Phenolen, wobei sehr unterschiedliche Zusammensetzungen und Gehalte auftreten. Dies ist weniger auf die Anatomie als auf den Genom und die Ausdifferenzierung einzelner Organe zurückzuführen. Im pflanzlichen Stoffwechsel wirken sie vor allem in den Adaptationsmechanismus gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen. Je nach genetischer Ausstattung der Pflanze variiert die Reaktionsweise der jeweiligen Phenole, sowohl der endogenen, als auch der applizierten, sehr deutlich.

Im Pflanzengewebe wirken Phenole als präinfektionelle Resistenzfaktoren für eine dauerhafte Abwehr von Pathogenen. Die Pflanze kann Phenole aber auch erst nach einer Infektion anreichern. Dabei wird hinsichtlich der Wirkungsweise der Phenole grundsätzlich zwischen löslichen und unlöslichen Polyphenolen unterschieden. An der Wirkung als Toxine zur Abwehr von Pathogenen der Pflanze oder als aggressive Substanz des Krankheitserregers sind relativ niedermolekulare, lösliche Phenole beteiligt. Sie können auf der anderen Seite aber auch die Besiedelung einer Pflanze durch Pathogene oder Symbionten begünstigen.

Im Gegensatz dazu bilden unlösliche Phenole oft Bestandteile von physikalischen Barrieren (Suberin, Lignin, polymere Tannine). Als Fraßschutz gegen Insekten werden hauptsächlich die Gerbstoffe bzw. Tannine gebildet und dafür speziell in die Zellwände eingelagert.

Polyphenole dienen neben der Resistenz gegen Phytopathogene auch der Abwehr von oxidativem Stress, dem die Pflanze u.a. durch ihren selbst produzierten Sauerstoff im hohen Maße ausgeliefert ist. Diese Funktion als Radikalfänger und Antioxidantien macht vor allem den ernährungsphysiologischen Nutzen der Phenole für den menschlichen Organismus aus.

Eine weitere Aufgabe der Phenole ist die Regulierung des Phytohormonhaushaltes der Pflanze. In diesem Zusammenhang wird p-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure meist eine wuchshemmende, Chlorgensäure hingegen eine wuchsfördernde Wirkung zugeschrieben. Auch an der Bodenmüdigkeit können Phenole beteiligt sein und sich dabei hauptsächlich allelopathisch auf die jeweiligen Kulturpflanzen auswirken (z.B. Phenolsäuren, Hydrochinone, Cumarine und Flavonoide). Darüber hinaus hemmen einige

phenolische Verbindungen (z.B. Rutin, Quercitrin, Ferulasäure) unter entsprechenden *pH*-Werten die Mineralstoffaufnahme der Pflanze.

Eine wichtige Schutzfunktion gegen *UV*-Licht haben in der Gruppe der Phenole vor allem die Flavonoide. Aufgrund der vielfältigen Farben einiger phenolischer Verbindungen, vor allem der Anthocyane, können sie zudem als Signalsubstanzen eingesetzt werden. Phenole tragen demnach neben dem Geschmack auch zum Aussehen vieler Obstarten bei.

Phenole sind sehr reaktive Substanzen. Sie bilden Wasserstoffbrücken aus, wenn keine Hemmung durch zusätzliche Seitenketten auftritt, was beispielsweise bei vielen Flavonoiden zu intramolekularen Verknüpfungen führt. Weiterhin besitzen sie die Fähigkeit, Chelate mit Metallen zu bilden.

Eine der für den Obst- und Gemüsebau ökonomisch bedeutendsten Eigenschaften der Phenole ist jedoch ihre leichte Oxidierbarkeit, die zur Gewebeverbräunung führt. Solche qualitätsmindernden Reaktionen treten bei mechanischer Belastung wie Druck- oder Schnittstellen, Alterung, Infektionen und zahlreichen physiologischen Krankheiten auf. Eine Möglichkeit der Oxidation der Phenole stellen die Peroxidasen da, die eine Oxidation der o-Diphenole zu ihren entsprechenden Quinonen in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) katalysieren. Sie sind jedoch limitiert durch die begrenzte Anwesenheit von endogenem H_2O_2 .

Die enzymatische oxidative Polymerisierung der Phenole und damit einhergehende Gewebeverbräunung findet in zwei Schritten statt. Zunächst erfolgt die enzymatische o-Hydroxilierung der Monophenole oder die enzymatische Oxidation der o-Diphenole katalysiert durch Polyphenoloxidasen (*PPO*) zu o-Quinonen mit Sauerstoffmolekülen als primäres Oxidationsmittel. Für die Enzymaktivität essentiell ist zusätzlich die Einbindung von Kupfer als prosthetische Gruppe der *PPO*. Diese Enzyme sind im gesunden Pflanzengewebe latent oftmals membrangebunden in den Plastiden der Zellen (auch in den Thylakoiden von Chloroplasten) lokalisiert. Wird die Kompartimentierung der Zelle gestört und vermischen sich die Plastiden (Enzyme) mit dem Inhalt der Vakuolen (Substrat), so kommt es zu einer Oxidation der Phenole durch die *PPO* (FEUCHT und TREUTER, 1989; YORUK und MARSHALL, 2003). Im zweiten Schritt erfolgt die nicht-enzymatische Polymerisierung der bereits farbigen o-Quinone zu den für diese Verbräunung typischen rötlich-braunen Polymeren (Melanine). Die Polyphenoloxidasen weisen eine hohe Affinität gegenüber Hydroxyzimtsäuren, insbesondere Kaffeesäure-Verbindungen auf (z.B. Chlorogensäure in Äpfeln). Flavonoide und Procyanidine werden hingegen weniger schnell katalysiert. Auch der Verbräunungsgrad ist abhängig von der ausgehenden phenolischen Verbindung. So trägt bspw. Catechin am meisten zur Verbräunung im Apfel bei (MURATA et al., 1995). Der Gehalt an Sauerstoff und seine Diffusionsgeschwindigkeit in der Lösung bzw. im Apoplasten und somit das Interzellularvolumen stellen den limitierenden Faktor der enzymatischen Oxidation der Phenole durch *PPO* dar. Die Aktivität der Polyphenoloxidasen ist zudem stark abhängig vom *pH*-Wert des umgebenden Mediums. In der Pflanzenwelt liegt das Optimum meist zwischen *pH* = 4,0 und *pH* = 8,0, jedoch wurde bspw. im Apfel ein optimaler

pH-Wert von 3,5 bis 4,5 gefunden (MURATA et al., 1995). Auch die Temperatur beeinflusst neben der Löslichkeit des für die Oxidation notwendigen Sauerstoffs die Reaktionsgeschwindigkeit der Polyphenoloxidasen. Bei niedrigen Temperaturen verläuft die Reaktion deutlich langsamer, wobei erhöhte Temperaturen zur Denaturierung des Moleküls führen können (ZHOU et al., 1993).

Um den ökonomischen Verlusten durch Verbräunungen entgegenwirken zu können, ist der Einsatz von Hemmstoffen der Polyphenoloxidase von besonderer Bedeutung. Bedeutende Reduktionsmittel der enzymatischen Verbräunung sind in der obstbaulichen Praxis das Diphenylamin (*DPA*) und das Schwefeldioxyd (SO_2), die jedoch in der Nahrungsmittelindustrie stark reglementiert wurden (AHVENAINEN, 1996). Ascorbinsäure wird als Alternative für Schwefeldioxyd vor allem in Fruchtsäften, Fruchtputees und geschnitten Früchten eingesetzt. Jedoch setzt sich die enzymatische Verbräunung fort, sobald das Vitamin C abgebaut wurde (FRIEDRICH et al., 1986). Durch die zusätzliche Gabe von Zitronensäure kann die Ascorbinsäure stabilisiert werden. Zudem verschiebt ein saures Milieu den *pH*-Wert unter 3, so dass die *PPO*-Aktivität gehemmt wird. Die meisten der Zusätze, um Verbräunungen des Fruchtgewebes zu verhindern, verändern allerdings den Geschmack des Produktes erheblich.

2.1.2 Ernährungsphysiologische Wirkung

Die aktuelle Diskussion und zunehmende Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Ernährung und Gesundheit erhöhen das Bewusstsein der Verbraucher gegenüber qualitativ hochwertigen Lebensmitteln und jenen, die zusätzlich gesundheitsfördernde Wirkungen versprechen (Functional-Foods: probiotische Produkte, Produkte mit Omega-3-Fettsäuren, *ACE*-Drinks). Das letztgenannte Attribut ist daher auch ein wichtiges Marketinginstrument für gartenbauliche Produkte. Der gesundheitliche Wert von Obst und Gemüse liegt im Zusammenwirken mehrerer Substanzen und nicht im Gehalt einzelner Vitamine oder Mineralstoffe, so dass Einzelpräparate im Vergleich dazu weniger als "gesunde" Nahrung geeignet sind. Auch der *Convenient*-Bereich gewinnt immer mehr an Bedeutung, da die Inhaltsstoffe der Produkte durch Verarbeitungsschritte weiterhin beeinflusst werden können (VAN BOECKEL und JONGEN, 1997; PRICE et al., 1999).

Gerade im Zusammenhang mit dem Verzehr von Wein, der einen hohen Anteil an Polyphenolen enthält, wurde in den Medien seit langem das sogenannte „*French Paradoxon*“ diskutiert. Dabei treten in der französischen Bevölkerung aufgrund ihres höheren Rotweinkonsums weniger durch Herzkrankheiten bedingte Todesfälle auf, obwohl die Risikofaktoren (Bluthochdruck, Übergewicht, Rauchen) ähnlich hoch ausgeprägt sind wie bei den Bewohnern anderer industrialisierter Länder. Mehrere epidemiologische Studien beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Beziehung zwischen der Aufnahme von Polyphenolen und einer Verminderung verschiedener Krankheiten (z.B. Krebs, Herz- und Kreislauferkrankungen). Die Ergebnisse dieser Studien werden jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert, da oftmals der *in vivo* Nachweis noch aussteht.

Die positiven Auswirkungen der Phenole auf den menschlichen Organismus werden in erster Linie ihren Fähigkeiten als Radikalfänger und Antioxidantien zugeschrieben, sie sind zumeist effektiver als Vitamin *E* und *C* (RICE-EVANS et al., 1997; MOURE et al., 2001). Sie tragen zur Einhaltung des Gleichgewichts an schädigenden (prooxidativen) und schützenden (antioxidativen) Vorgängen im Körper bei. Phenolische Verbindungen fangen schädliche Radikale, insbesondere Sauerstoffradikale (z.B. Superoxid-Anion (O_2^-), Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot), Singlett Sauerstoff (1O_2), ab oder sie konkurrieren mit anderen Substanzen um die Bindung von aggressiven Sauerstoffformen und unterbinden somit die durch sie hervorgerufenen schädigenden Kettenreaktionen (FEUCHT & TREUTTER, 1989; KAUER und KAPOOR, 2001). Freie Radikale sind äußerst instabile und sehr reaktive chemische Verbindungen, so dass immer neue Radikale ausgebildet werden, was zu einer Kettenreaktion führt. Sie rufen zwar antibakterielle und antivirale Wirkungen hervor, auf der anderen Seite können sie aber menschliche Zellen verändern oder zerstören und somit Degenerationen, Entzündungen und maligne Krankheiten fördern. Durch die Überführung der freien Radikale in stabile, langlebige Substanzen sind die Antioxidantien in der Lage, diese Reaktionskette zu unterbrechen.

Singlett Sauerstoff (1O_2) kann bspw. durch Energietransfer eines photochemisch aktivierten Triplett-Zustandes aus molekularem Sauerstoff entstehen und sich negativ auf Aminosäuren und mehrfach ungesättigten Fettsäuren auswirken (FEUCHT und TREUTTER, 1989). Die aggressiven Formen des Sauerstoffs sind darüber hinaus in der Lage Lipoproteine, Desoxyribonukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide zu oxidieren und zu schädigen. Die Lipid-Peroxidation hat bspw. Membranschädigungen zur Folge. Es können toxische Substanzen mit karzinogener, zellmutierender oder alternder Wirkung entstehen. Durch Flavonoide, denen unter den Phenolen die größte Bedeutung als Radikalfänger und Antioxidantien zugeschrieben wird, insbesondere den Flavan-3-ols und den Procyanidinen, wird diese Fett-Peroxidation gehemmt, indem sie als H^+ -Donatoren Wasserstoff an die Peroxy-Radikale abgeben (KAUER und KAPOOR, 2001; VERSTRAETEN et al., 2003). Durch die Fähigkeit der Phenole, Proteine zu binden oder redoxaktive Metallionen in Chelaten zu fassen, können oxidative Reaktionen ebenfalls unterbunden werden.

Die anticancerogene und antimutagene Wirkung der Polyphenole ist noch nicht eindeutig geklärt, da ihnen in einigen Studien wiederum Mutagenität nachgewiesen wurde, besonders im Zusammenhang mit der Präsenz von Metallionen (LAUGHTON et al., 1991; HERTOGE et al., 1994; HOLLMANN et al., 1996; RICE-EVANS et al., 1997; LIU, 2000, 2002; OLIVEIRA und WATSON, 2001; TERRY et al., 2001). Sie sind jedoch zumindest in der Lage, die freien Radikale, die sozusagen präcancerogene Vorstufen darstellen, zu hemmen (RECHNER, 2000; MAZZA, 2002). Während bspw. Catechine eine hemmende Wirkung der Peroxidation von Membranfetten nachgesagt wird, können Tannine hingegen DNS-Brüche verursachen und somit zu Mutationen oder Krebszellenbildung führen. Andererseits werden Tanninen wiederum die größten gesundheitsfördernden Effekte nachgesagt (KAUER und KAPOOR, 2001). Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulasäure gelten als Reduktoren der Mutationsrate, Quercetin wird sowohl eine positive Wirkung gegen Krebs als auch eine Förderung von Mutationen zugeschrieben (MACGREGOR und JURD, 1978;

SCHIMMER et al., 1988; FEUCHT und TREUTTER, 1989; LEE et al., 2003a, 2003b). Flavonoiden konnte zwar ein hemmender Effekt auf die Sterblichkeitsrate bedingt durch koronare Herzkrankheiten nachgewiesen werden, jedoch bestand kein Zusammenhang zwischen ihrer Einnahme und der Todesrate durch allgemeine Krebserkrankungen (HOLLMANN et al., 1996). Die positiven Wirkungen auf koronare Herzerkrankungen sind hingegen sehr viel weniger widersprüchlich als die anticancerogenen Effekte von Phenolen (HERTOG et al., 1993; MEYER et al., 1998; LIU, 2002; VERSTRAETEN et al., 2003; DA SILVA PORTO et al., 2003; HUBBARD et al., 2003; BOYER und LIU, 2004). Grundsätzlich können Antioxidantien also präventiv gegen Tumore oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt werden, da sich aber bspw. Tumore selbst durch Antioxidantien gegen den Abwehrmechanismus des Körpers schützen, ist ihr Einsatz in diesem Stadium eher behinderungsfördernd bzw. krankheitsfördernd.

Trotz ihres Allergiepotentials (z.B. Kontaktdermatitis) wird den Polyphenolen auch eine antiallergene Wirkung nachgesagt, da sie das Entstehen von Histamin hemmen (MATSUO et al., 1997; ALEXANDRAKIS et al., 1999; KOTANI et al., 2000; MASTUDA et al., 2002; CORREALE und MARKS, 2002). Auch auf die Resorption im menschlichen Organismus üben sie gegensätzliche Einflüsse aus. Polyphenole können aufgrund ihrer Reaktionsfähigkeit mit Proteinen einen hemmenden Effekt auf die Verdauungsenzyme ausüben (MOLE et al., 1990). Andererseits wirkt sich das antioxidative Potential der Flavonoide so auf den Darm aus, dass spezielle Inhaltsstoffe stärker resorbiert werden können, da ihre vorherige Oxidation unterbunden wird. Aber auch die Polyphenole selbst bzw. ihr antioxidatives Potential werden durch andere aufgenommene Nahrungsstoffe gehemmt bzw. gefördert (ALEXANDROPOULOU et al., 2005).

Die Schädigungen durch freie Radikale können auf lange Sicht eine Reihe von Krankheiten wie Arteriosklerose, Arthritis, Lungenerkrankungen, Photoalterung der Haut, Augenkrankheiten, chronische Nieren- und Lebererkrankungen, Morbus Crohn oder Krebs zur Folge haben. Des Weiteren sollen Flavonoide positiv gegen Diabetes mellitus (hier vor allem das Phloridzin aus Äpfeln), Parasiten (antiviral (z.B. Herpes), antimikrobiell, antimykotisch), Thrombosebildung, koronare Herzerkrankungen, Depressionen (Johanniskraut) und Entzündungen wirken (HERTOG et al., 1993; MEYER et al., 1998; METZ, 2000; BUSCHMANN, 2002; WROLSTAD, 2001). In der Bekämpfung des oxidativen Stresses werden den Phenolen zudem synergistische Effekte mit oder regenerative Wirkungen von antioxidativ wirksamen Vitaminen zugeschrieben (z.B. L-Ascorbinsäure, α -Tocopherol, β -Carotin) (FANG et al., 2002; VERSTRAETEN et al., 2003; ZHOU et al., 2005). Tocopherole wirken zudem auch allein als Blocker gegen schadhafte Oxidation der lipophilen Membranen. Einige Flavonoide wirken bspw. als Inhibitoren der Ascorbinsäure-Zerstörung. Neben den Phenolen werden auch die physiologischen und pharmakologischen Effekte weiterer sekundärer Pflanzenstoffe auf den menschlichen Organismus diskutiert, wie bspw. die in Obst- und Gemüseprodukten sehr stark vertretenen Carotinoide.

Durch den Einfluss von Sauerstoff und Licht können Flavonoide zu unlöslichen Polymeren transformiert und vom menschlichen Organismus nicht mehr resorbiert werden. Zudem liegen die phenolischen Sub-

stanzen in den Pflanzen meist gebunden an Zuckerresten oder organischen Säuren vor, so dass sie zwar wasserlöslicher werden aber dafür weniger leicht passiv durch biologische Membranen diffundieren können. Die Aufnahme erfolgt in Abhängigkeit des gebundenen Zuckers, der auch in der Bindungsposition variieren kann (WILLIAMSON et al., 2000). Deshalb sind bei der ernährungsphysiologischen Betrachtung der Polyphenole nicht nur der Gehalt in der Frucht, sondern auch ihre Absorption und ihr Metabolismus im Dün- und Dickdarm, in der Niere und in der Leber zu berücksichtigen. Die Substanzen können nur dann ihre volle Wirkung entfalten, wenn sie unverändert und in ausreichenden Mengen an den entsprechenden Wirkungsort im Körper gelangen. Den Anthocyanen konnte bspw. *in vitro* ein hohes antioxidatives Potential nachgewiesen werden, dessen Bedeutung aufgrund ihrer geringen Bioverfügbarkeit *in vivo* allerdings als fraglich zu betrachten ist (FLESCHHUT, 2004). Ähnliches gilt für die Flavonoide im allgemeinen (OLIVEIRA und WATSON, 2001). In anderen Studien wurde die gute Aufnahme von Kaffeesäure (z.B. aus Apfelsäften) im Gegensatz zur geringeren Absorption der größeren Moleküle, der Proanthocyanidine, belegt (BITSCH et al., 2000; SCALBERT et al., 2002). Auch bei Quercetin konnte eine ausreichende Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden (GEE et al., 1998). Über die Nahrung werden hauptsächlich Flavonole, Flavanone und Catechine, gefolgt von Anthocyanidinen und Procyanidinen sowie Phloretin zugeführt. Generell passieren die meisten Flavonoide den Darmtrakt als Aglykone (Reinsubstanzen) wo sie absorbiert und transformiert werden. Die glykosidierten Formen werden eher in geringem Maße aufgenommen, die Absorption erfolgt zumeist erst nach Hydrolyse der phenolischen Zucker-Verbindungen durch im Dün- (β -Glucosidasen oder Phloridzin Hydrolase) oder Dickdarm (β -Glucosidasen, β -Rhamnosidasen, Esterasen) vorkommende Hydrolasen (WILLIAMSON et al., 2000; BOYER und LIU, 2004). Mit Hilfe sogenannter Zucker-Transporter (*SGLT1*, *sodium-dependent glucose transporter*) können aber auch einige glykosidierte phenolische Substanzen (z.B. Quercetin-3-glucosid) im Dünndarm aufgenommen werden (PAGANGA und RICE-EVANS, 1997; GEE et al., 1998; WILLIAMSON et al., 2000; LIU, 2002). Nach der Aufnahme erfolgt die Methylierung und Hydroxylierung der Phenole. Im Dickdarm geht die Hydrolyse zumeist mit einem Abbau der Flavonoid-Aglykone zu einfachen phenolischen Verbindungen mittels Ring-Spaltung einher (WILLIAMSON et al., 2000).

2.1.3 Phenole im Obst

Sekundäre Pflanzenstoffe, darunter auch die Phenole, werden im Obst z.B. als Farb-, Duft-, Geschmacks- und Signalstoffe produziert. Die Zusammensetzung an Fruchtpolyphenolen ist genetisch kontrolliert und stellt somit ein charakteristisches Polyphenolprofil, einen eigenen „*fingerprint*“ für jede Frucht dar. Darüber hinaus wird ihnen auch eine Reihe von physiologischen Wirkungen auf den menschlichen Organismus nachgesagt. Die wichtigsten im Obst vorkommenden Phenole lassen sich in drei Klassen einteilen (FRIEDRICH et al., 1986; TREUTTER, 2001):

- (1) Die Phenolcarbonsäuren, die häufig an organischen Säuren oder Zuckern als Ester gebunden sind und somit als wasserlösliche Glykoside vorliegen, werden wiederum in zwei Gruppen unterteilt:

- Die Hydroxyzimtsäure Verbindungen (z.B. p-Coumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure (Abb. 2.1.3) sind die wichtigsten Strukturen in Früchten.

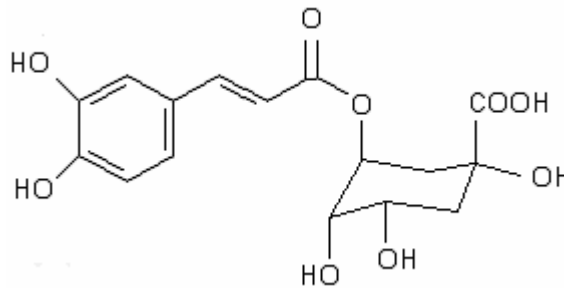


Abb. 2.1.3: Strukturformel der Chlorogensäure.

- Hydroxybenzoesäure Verbindungen (z.B. p-Hydroxybenzoesäure, Gallussäure, Vanillinsäure, Ellagsäure (Abb. 2.1.4) sind im Gegensatz dazu in den Früchten ggf. nur in geringen Konzentrationen ($< 1\text{ mg/kg}$) vertreten. Sie tragen zur Verstärkung der pflanzlichen Zellwände bei, da durch Polymerisation Lignine gebildet werden.

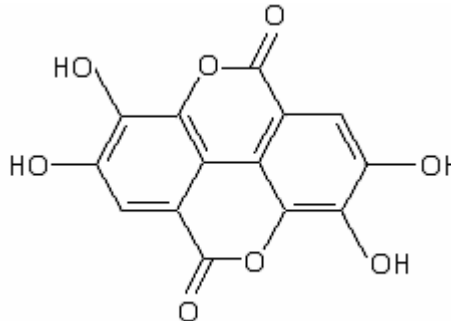


Abb. 2.1.4: Strukturformel der Ellagsäure.

- (2) Die Flavonoide sind mit über 4000 bekannten Verbindungen die bedeutendsten Phenole und kommen in den meisten Pflanzen vor. Ihr Grundkörper besteht aus einem $C_6-C_3-C_6$ -Gerüst, wobei der erste Ring ein aromatischer ist, verschmolzen mit dem zweiten, heterocyclischen, Sauerstoff beinhaltenden Ring, welcher wiederum mittels $C-C$ -Bindung mit einem dritten aromatischen Ring verbunden ist (PETERSON und DWYER, 1998). Tiere sind nicht in der Lage, diesen Flavan-Grundkörper, von welchem sich die Flavonoide strukturell ableiten, zu synthetisieren. Flavonoide liegen meist an Glucose gebunden vor und wirken somit weniger reaktiv gegen freie Radikale. Dafür sind sie in dieser Form wasserlöslicher, so dass sie in der Vakuole gespeichert werden können. Ein wichtiger Regulationsfaktor der Flavonoid-Biosynthese ist das Licht, insbe-

sondere blaues und *UV*-Licht, das bspw. spezifisch auf die Induktion der Synthese von Flavon- und Flavonolglykosiden wirkt und die Anthocyanbildung stimuliert. Zu den wichtigsten Untergruppen der in Früchten vorkommenden Flavonoide gehören Anthocyanidine, Flavonole, Dihydrochalkone, Flavan-3-ole, Proanthocyanidine, Flavone (z.B. Luteolin, Apigenin) und Flavonone (hauptsächlich in Zitrusfrüchten; z.B. Hesperidin, Naringin). Die beiden letztgenannten sind jedoch nicht in Kern-, Beeren- und Steinobst vorzufinden.

- (3) Zu der Gruppe der niedermolekularen Phenole zählen meist flüchtige Phenole, zum Teil wichtige Aromastoffe. Sie sind oftmals Bruchstücke oder Reststücke von polymeren phenolischen Verbindungen.

Die Anthocyanidine (z.B. Cyanidin (Abb. 2.1.5), Malvidin, Pelargonidin) liegen in Pflanzen nur glykosidisch als Anthocyane im Zellsaft der Vakuolen, überwiegend in den Epidermis- und Subepidermiszellen der Früchte vor. Dabei werden die Zuckerreste (vorwiegend Glucose, Galaktose, Rhamnose und Arabinose) bevorzugt am C_3 -Atom über eine Sauerstoffbrücke gebunden (RICHTER, 1997; RECHNER, 2000). Die meist rötliche, blaue oder violette, intensive Farbe der Anthocyane verändert sich in Abhängigkeit des *pH*-Wertes. Sie variiert von rot im sauren *pH*-Bereich über farblos bis zu blau bei basischen *pH*-Werten. Zudem führt die intermolekulare Copigmentierung der Anthocyane (z.B. mit Polyphenolen, Alkaloiden, organischen Säuren) zu einer Intensivierung der Farbe durch Verschiebung der Absorption in den kürzerwelligen Bereich (hypsochrmer Effekt) und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt). In den heimischen Regionen bestimmen die Anthocyane vor allem das Erscheinungsbild der Beerenfrüchte und sind ebenso ausschlaggebend für die rote Deckfarbe der Sonnenzugewandten Seite der Äpfel Früchte, (WOLFE und LIU, 2002).

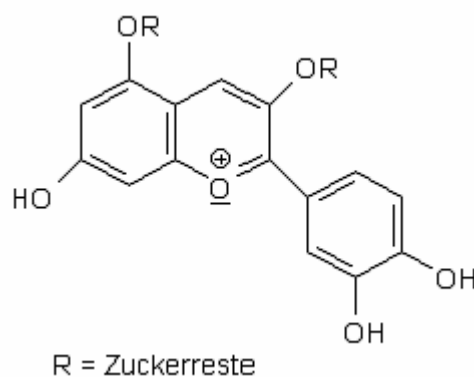


Abb. 2.1.5: Strukturformel von Cyanidin.

Die Flavonole (z.B. Kaempferol, Quercetin (Abb. 2.1.6)) sind in den heimischen Obstarten meist durch eine Sauerstoffbrücke am C_3 -Atom mit Zuckerresten, hauptsächlich Glucose und Rhamnose verbunden

(RICHTER, 1997; RECHNER, 2000). Ihre Bildung ist lichtabhängig, so dass die hellgelben Flavonolglukoside bevorzugt in der Schale von Früchten vorkommen.

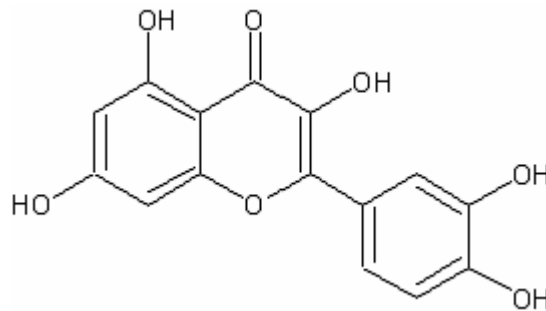


Abb. 2.1.6: Strukturformel von Quercetin.

Die schwach gelben Dihydrochalkone (z.B. Phloretin (Abb. 2.1.7), Phloridzin) sind vor allem charakteristisch für den Apfel, wo sie als Nachweis für Apfelprodukte eingesetzt werden, sie kommen dagegen nur selten in anderen Obstarten vor.

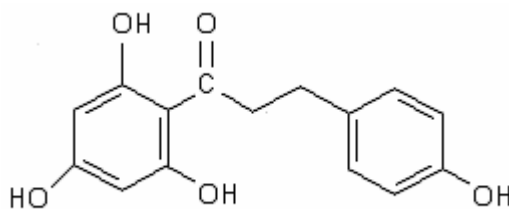


Abb. 2.1.7: Strukturformel von Phloretin.

Die Flavan-3-ole (hauptsächlich (+)-Catechin (Abb. 2.1.8), (-)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin) sind hingegen in allen heimischen Früchten vorhanden. Aus ihnen bilden sich durch enzymatische und chemische Kondensation die Proanthocyanidine (Abb. 2.1.9). Entsprechend ihres Polymerisationsgrades sind sie bei einem geringen Polymerisationsgrad farblos und tragen zu einem bitteren Geschmack bei oder aber sie sind bei hohem Polymerisationsgrad gelblich bis braun und adstringierend. Die Procyanidine (B1-B4) sind am weitesten verbreitet und entstehen aus reiner Catechin-/Epicatechin-Kondensation. Die Flavan-3-ole und die Leucoanthocyanidine bilden die Gruppe der kondensierten Gerbstoffe, die nicht oder nur gering hydrolysisierbar sind (RICHTER, 1997).

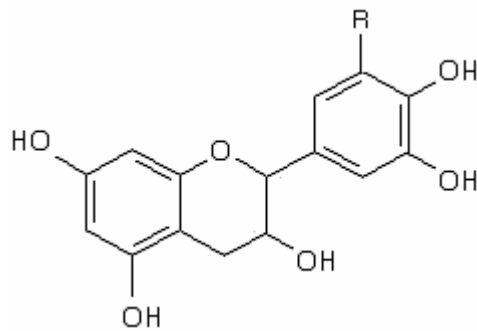


Abb. 2.1.8: Strukturformel der Catechine.

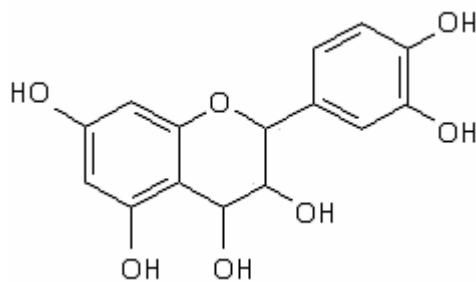


Abb. 2.1.9: Strukturformel der Procyanidine

In Deutschland werden jährlich durchschnittlich etwa eine Million Tonnen Tafeläpfel geerntet (STURM, 2005). In Europa und den Vereinigten Staaten ist der Apfel neben Zwiebel und Tee eine bedeutende Quelle für die Aufnahme von Flavonoiden. In verschiedenen Studien konnte der Einnahme von bspw. Quercetin, Chlorogensäure, Procyanidine und Catechin durch den Konsum von Äpfeln eine hemmende Wirkung auf diverse Krebserkrankungen und ein allgemein hoher antioxidativer Effekt nachgewiesen werden, wohingegen Tee, dessen Gehalt an Catechinen bspw. viel höher ist, keine derartigen Effekte hatte (HERTOG et al., 1993; KNEKT et al., 1997, 2002; SAWA et al., 1999; LE MARCHAND et al., 2000; ARTS et al., 2001; VINSON et al., 2001; WOLFE und LIU, 2002; DA SILVA PORTO et al., 2003). Die im Apfel enthaltenen Flavonoide tragen zudem zu einer verminderten Sterberate bedingt durch chronische Erkrankungen bei (HERTOG et al., 1994; KNEKT et al., 2000; EBERHARDT et al., 2000).

Tab. 2.1.2: Gehalt an Polyphenolen in Apfelfrüchten gemessen an verschiedenen Sorten (FG: Frischgewicht, TG: Trockengewicht).

Phenol	Gehalt [mg / 100g]	Quelle
Chlorogensäure	9,02 FG	LEE et al., 2003a
	3-43 FG	PODSEDEK et al., 2000
	13,61 FG (Schale)	TSAO et al., 2003
	17,73 FG (Fruchtfleisch)	
	18,4-20,6 FG	VAN DE SLUIS et al., 2001
	6-20 FG	HERRMANN, 2001
Kaffeesäure	0,8-3,8 FG (Schale)	ESCARPA und GONZÁLEZ, 1998
	0,2-1,1 FG (Fruchtfleisch)	
Epicatechin	8,65 FG	LEE et al., 2003
	11,4-12,8 FG	VAN DE SLUIS et al., 2001
	8,2-48,1 FG (Schale)	ESCARPA und GONZÁLEZ, 1998
	1,9-11,1 FG (Fruchtfleisch)	
	5,04 FG	DRAGOVIC-UZELAC et al., 2005
	120-575 TG (Schale)	TREUTTER, 2001
	21-83 TG (Fruchtfleisch)	
Catechin	0,4-2,1 FG	PODSEDEK ET AL., 2000
	7,40 FG (Schale)	TSAO et al., 2003
	2,07 FG (Fruchtfleisch)	
	1,5-1,9 FG	VAN DE SLUIS et al., 2001
	6,6-48,6 FG (Schale)	ESCARPA und GONZÁLEZ, 1998
	2,8-18,2 FG (Fruchtfleisch)	
Quercetinglykoside (z.B. Rutin)	13,20 FG	LEE et al., 2003
	13,6-67,1 FG (Schale)	ESCARPA und GONZÁLEZ, 1998
	0,46 FG	DRAGOVIC-UZELAC et al., 2005
	27-134 TG (Schale)	TREUTTER, 2001
	1-4 TG (Fruchtfleisch)	
Phloretinyglykoside	6,37 FG	DRAGOVIC-UZELAC et al., 2005
	1,0-15,8 FG	RECHNER, 2000
	1,2-41,8 FG (Schale)	ESCARPA und GONZÁLEZ, 1998
	0,4-2,0 FG (Fruchtfleisch)	
	5,59 FG	LEE et al., 2003
Procyanidine (B2)	6,9-65,9 FG (Schale)	ESCARPA und GONZÁLEZ, 1998
	2,3-10,5 FG (Fruchtfleisch)	
	10,36-36,02 FG (Schale)	PEREZ-ILZARBE et al., 1991 (zit. nach HERRMANN, 2001)
	1,51-5,52 FG (Fruchtfleisch)	
Cyanidin-3-Glykoside	9,5-10 FG	MAZZA und VELIOGLU, 1992

In Äpfeln sind phenolische Verbindungen in unterschiedlichen Gehalten nachgewiesen worden (PEREZ-ILZARBE et al., 1991; MAYR et al., 1995, 1996; ESCARPA und GONZALEZ, 1998; PODSEDEK et al., 2000; VAN DE SLUIS et al., 2001; TREUTTER, 2001; LEE et al., 2003; KUCZYNSKI, 2003; TSAO et al., 2003; VEBERIC et al., 2005). Im Apfelfruchtfleisch sind vor allem Hydroxyzimtsäurederivate, Flavan-3-ole und Procyanidine enthalten. Die Procyanidine tragen dabei mit ca. 40 % bis 60 % zum Gesamtphenolgehalt in Äpfeln bei, welcher etwa 0,01 % bis 1 % des Frischgewichtes ausmacht (RECHNER, 2000; SCHIEBER et al., 2001; WOLFE und LIU, 2002). Die Anthocyane, Flavonole und Quercetin und seine Derivate konnten vor allem in der Apfelschale nachgewiesen werden. Die Dihydrochalkone konnten hauptsächlich in den Kernen, aber auch im Fruchtfleisch und in der Schale nachgewiesen werden (ESCARPA et al., 1998; WOLFE und LIU, 2002). Die phenolischen Substanzen liegen im Apfel im Gegensatz zu anderen Früchten häufig in ungebundener Form vor (SUN et al., 2002).

Die äußerst inhomogene Verteilung, die jeweilige Zusammensetzung und die Gehalte der einzelnen Phenole variieren erheblich in Abhängigkeit der Apfelsorte, des Entwicklungsstadiums, des klimatischen Einflusses und des Verarbeitungsgrades von Apfelprodukten (FEUCHT und TREUTTER, 1989; MAYR et al., 1995). Die Flavonoide sind dabei relativ stabil gegen Hitze, moderate Säuregehalte und Sauerstoff (ESCARPA und GONZALEZ, 1998; PETERSON und DWYER, 1998; AWAD et al., 2000a, 2000b, 2001a; VAN DER SLUIS et al., 2001; SCHIEBER et al., 2001; KONDO et al., 2002; WOLFE et al., 2003). In der Tabelle 2.1.2 ist eine Zusammenstellung der verschiedenen bisher identifizierten Polyphenole im Apfel anhand von Ergebnissen einiger Veröffentlichungen aufgelistet.

Im Bereich des Beerenobsts gehören die Erdbeeren zu den wirtschaftlich wichtigsten Beeren in Deutschland. Die Erdbeerproduktionsflächen in Deutschland vergrößern sich zunehmend (WUERTENBERGER, 2005). Neben dem hohen Gehalt an Vitamin C haben sie durch ihren Gehalt an Polyphenolen darüber hinaus eine ernährungsphysiologische Bedeutung. Besonders der Ellagsäure wird dabei ein antimutagener und anticancerogener Einfluss nachgesagt (TÖRRÖNEN und MÄÄTTÄ, 2002).

Auch in den Erdbeeren wurden unterschiedliche Gehalte an phenolischen Verbindungen nachgewiesen (TREUTTER et al., 1991; GIL et al., 1997; HOLCROFT und KADER, 1999). Die rote Farbe der Früchte weist bereits auf einen hohen Gehalt an Anthocyanen in der Fruchtschale hin. Dabei handelt es sich in erster Linie um das Pelargonidin-3-Glucosid und nur geringen Gehalten an Cyanidinglykosiden (HERRMANN, 2001). Bei den Phenolcarbonsäuren ist die Hydroxyzimtsäure p-Cumaroyl-Glucose vorherrschend gegenüber den Hydroxybenzoesäure-Verbindungen. Zu letzteren gehört die Ellagsäure, die entgegen der in der Literatur oft erwähnten Annahme (PERKINS-VEAZIE, 1995; LUNKENBEIN, 2006; HERRMANN, 2001) in dieser Form jedoch in den Früchten nicht nachgewiesen werden kann. Das Aglykon wird wahrscheinlich erst durch den Extraktionsprozess für die Messung mit Hilfe von chromatographischen Methoden aus den in der Frucht vorliegenden Ellagitanninen gebildet (TREUTTER, Fachgebiet Obstbau der Technischen Universität München, persönliche Mitteilung; TÖRRÖNEN und MÄÄTTÄ, 2002). Von den Flavan-3-olen

konnten in erster Linie Catechin und Epicatechin in den Erdbeeren nachgewiesen werden, bei den Proanthocyanidinen ist B3 vorherrschend. Als Flavonole wurden hauptsächlich Kämpferol- und Quercetin-Glykoside in den Beeren gefunden. In Tab. 2.1.3 sind die bisher ermittelten Gehalte der in Erdbeeren enthalten Polyphenole aufgelistet.

Tab. 2.1.3: Gehalt an Polyphenolen in Erdbeerfrüchten gemessen an unterschiedlichen Sorten in Anlehnung an HERRMANN (2001) und ergänzt (FG: Frischgewicht, TG: Trockengewicht).

Phenol	Gehalt [mg / 100 g]	Quelle
<i>p-Cumaroyl-Glucose</i>	1,4; 2,7 FG	SCHUSTER und HERRMANN, 1985
<i>Ellagsäure</i>	43-464 TG	MAAS et al., 1991
	53 + 3 FG	TÖRRÖNEN und MÄÄTTÄ, 2002
<i>Epicatechin</i>	1,2 FG	STÖHR und HERRMANN, 1975
<i>Catechin</i>	0,6-7,6 FG	STÖHR und HERRMANN, 1975
	4-6 FG	TÖRRÖNEN und MÄÄTTÄ, 2002
<i>Quercetin- und Kämpferolglykoside</i>	bis 16,5 FG	HENNING, 1981
	0,2-0,9 FG (Kämpferol)	TÖRRÖNEN und MÄÄTTÄ, 2002
	0,3-0,5 FG (Quercetin)	
<i>Pelargonidin</i>	48-128 FG	PERKINS-VEAZIE, 1995
<i>Procyanidine</i>	6 FG	TÖRRÖNEN und MÄÄTTÄ, 2002

2.2 Fluoreszenz

2.2.1 Physikalisch-chemischer Hintergrund von Fluoreszenzerscheinungen

Die Fluoreszenz gehört zu den Phänomenen der *Photolumineszenz*. Bei Anregung mit Strahlung im ultravioletten bis infraroten Wellenlängenbereich absorbieren einige Moleküle Energie, die sie nach einer gewissen Zeitdifferenz (Lebenszeit) als Strahlungsenergie ohne Anteil an thermischer Energie wieder abgeben. Die Fluoreszenzlebenszeit stellt eine oftmals sehr kurze zeitliche Verzögerung der Photolumineszenz nach der Anregung dar. Sie wird mit Hilfe ihres Abklingens nach Aussetzen der Anregung festgestellt. Es gibt zwei Arten von Photolumineszenz, die sich im wesentlichen zeitlich unterscheiden lassen: Während bei der Fluoreszenz die absorbierte Energie innerhalb von 0,1 ns bis 100 ns nach der Anregung wieder abgegeben wird, setzt die Strahlungsemission der Phosphoreszenz frühestens nach 1 ms ein. Im Folgenden soll näher auf die Methodik der Fluoreszenzspektroskopie, also die Aufnahme von Fluoreszenzspektren zur Identifizierung von Substanzen, und die Messung von Fluoreszenzintensitäten zur quantitativen Analyse eingegangen werden (FÖRSTER, 1951; DANCKWORTT und EISENBRAND, 1964; SCHWEDT, 1981; BUSCHMANN und GRUMBACH, 1985; GUILBAULT, 1990; VON Willert et al., 1995; RICHTER, 1997).

Moleküle, die in der Lage sind, Strahlung im sichtbaren Wellenlängenbereich zu absorbieren, werden als Chromophore bezeichnet. Im Gegensatz dazu spricht man speziell bei Molekülen, bei denen durch Anregung mit Lichtenergie Fluoreszenzerscheinungen auftreten, von Fluorophoren. Die durch die Absorption des Lichts aufgenommene Energie kann auf unterschiedlichen Wegen wieder abgegeben werden. Einen schematischen Überblick über diese Prozesse gibt das Jablonski-Diagramm (Abb. 2.2.1) (FÖRSTER, 1951; SCHWEDT, 1981; GUILBAULT, 1990; WEHRY, 1990b; VON WILLERT et al., 1995; ALBANI, 2001).

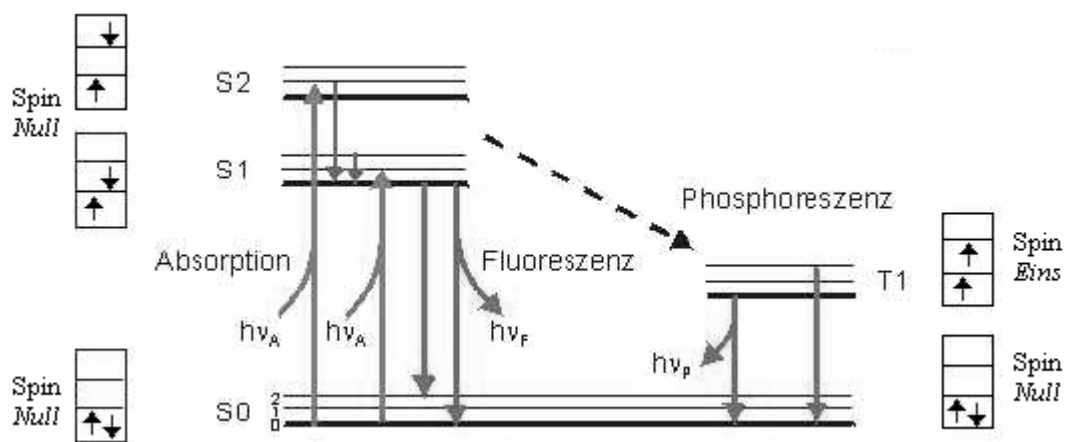


Abb. 2.2.1: Jablonski-Diagramm.

Das Energieniveauschema eines Moleküls unterteilt sich demnach in ein System aus Singulettzuständen ($S_0 \dots S_n$) mit dem Gesamtelektronenspin Null und ein System aus Triplettzuständen ($T_0 \dots S_n$) mit dem Gesamtelektronenspin Eins. Zwischen benachbarten elektronischen Zuständen befinden sich des weiteren Schwingungs- Rotationsniveaus mit jeweils abnehmender Energiedifferenz zwischen den einzelnen Niveaus (FÖRSTER, 1951). Die im Folgenden beschriebenen Energieaustauschprozesse innerhalb dieser Zustandssysteme lassen sich in drei Kategorien unterteilen:

- (i) Übergänge von einem niedrigeren in ein höheres Energieniveau durch Absorption elektromagnetischer Strahlung;
- (ii) Strahlungslose Übergänge;
- (iii) Übergänge von einem höheren zu einem niedrigeren Energieniveau verbunden mit der Emission von elektromagnetischer Strahlung.

Wird Lichtenergie im ultravioletten (*UV*), sichtbaren (*VIS*) oder infrarotem (*IR*) Wellenlängenbereich absorbiert, dann kommt es bei Zufuhr ausreichender Energie zur Anregung, im Zuge dessen ein Elektron von dem energetisch geringen Grundzustand S_0 , also dem äußersten besetzten Molekülorbital, in einen energetisch höheren Singulett-Zustand S_n übergeht. Der Atomabstand innerhalb des Moleküls ändert sich während des Elektronenübergangs nicht, da diese äußerst schnell ablaufen (Franck-Condon-Prinzip). Der Elektronensprung erfolgt demnach vertikal zwischen den Molekülorbitalen, die sich bezogen auf die Bindungen im Molekül auf unterschiedlichen Energieniveaus befinden. Ein Molekül kann nur dann optisch angeregt werden, wenn die Energie des eintreffenden Photons so groß ist wie die Energiedifferenz zwischen S_0 und einem angeregten Zustand S_n . Durch zu geringe Energiezufuhr kommt es nur zu einer Erwärmung durch stärkere Vibration oder Rotation des Moleküls, wohingegen eine zu hohe Energieaufnahme eine photochemische Zersetzung zur Folge haben könnte. Der innere Übergang vom angeregten Zustand S_n ($n > 1$) zum energetisch niedrigsten Niveau des angeregten Zustands (S_1) erfolgt in der Regel strahlungslos (*internal conversion*). Innerhalb von weniger als 0,1 ns wird der Überschuss an Schwingungsenergie durch Kollisionen mit anderen Molekülen wieder abgegeben. Zwar kann bei diesem Übergang von S_n zu S_1 auch Strahlung abgegeben werden ($\leq 10^{-9}$ s), sie konkurriert jedoch mit der strahlungslosen Energieabgabe, die um mindestens eine Größenordnung größer ist. Es gibt im Folgenden drei Möglichkeiten des Übergangs vom untersten nicht besetzten Molekülorbital S_1 in den Grundzustand S_0 :

- (i) Das Elektron fällt vom angeregten Zustand (S_1) durch die Abgabe eines Photons mit der Energie (Fluoreszenzemission), die es für die Rückkehr braucht, in den Grundzustand S_0 zurück.
- (ii) Erfolgt die Rückkehr des Elektrons in den Grundzustand (S_0) über einen strahlungslosen Übergang vom angeregten Singulett-Zustand (S_1) durch Spinumkehr zu einem Triplett-Zustand (T_1) (*intersystem crossing*), wird die überschüssige Energie bei einem wesentlich

langsameren Übergang durch erneute Spinumkehr von T_1 zu S_0 als Phosphoreszenzstrahlung freigegeben.

- (iii) Eine strahlungslose Alternative stellt die Übergangsmöglichkeit durch innere Umwandlung (*internal conversion*) und Abgabe von Wärmestrahlung dar.

Die Fluoreszenzemission muss demnach mindestens genauso schnell verlaufen wie die dazu im Wettbewerb stehenden strahlungslosen und photochemischen Prozesse, damit Fluoreszenzstrahlung auftreten kann. Es wird weiterhin deutlich, dass die aufgenommene Energie durch Absorption höher ist als die abgegebene Energie der Fluoreszenz (DANCKWORTT und EISENBRAND, 1964; GUILBAULT, 1990). Diese Energiedifferenz erklärt sich durch die strahlungslose innere Umwandlung und spiegelt sich in einer größeren Wellenlänge im Emissions- als im Absorptionsspektrum wieder (Stokesscher Shift) (Abb. 2.2.2). Sonderfälle wie z.B. Doppelphotonenanregung wurden in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet.

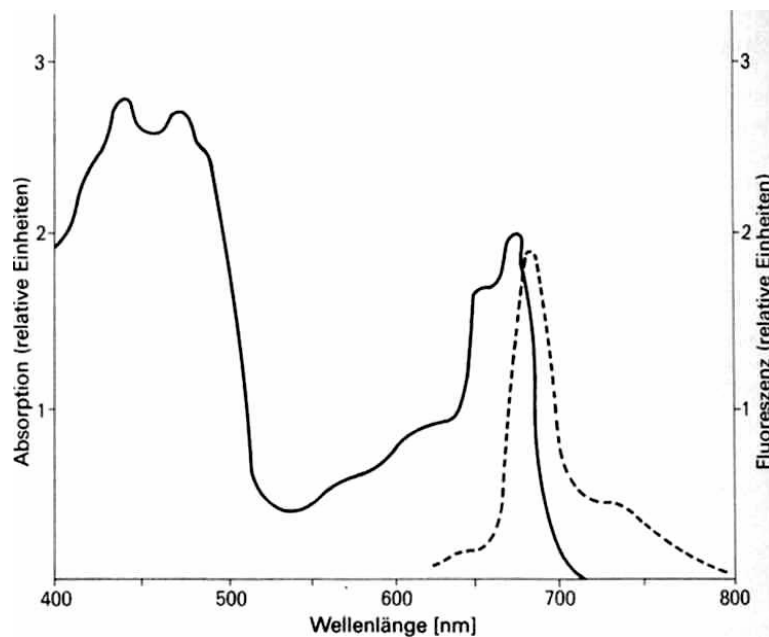


Abb. 2.2.2: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (---) von Photosystem II aus Weizenchloroplasten (nach GASANOV et al. zit. in HÄDER, 2002).

2.2.2 Fluoreszenzfähigkeit

Im Vergleich zu den zahlreichen organischen und anorganischen Verbindungen, die mit Hilfe photometrischer Analyse wie Absorptions- und Reflexionsspektroskopie bestimmt werden können, besitzen bedeutend weniger Substanzen die Fähigkeit zu fluoreszieren (GUILBAULT, 1990). Somit zeichnet sich die Fluoreszenzspektroskopie gegenüber der Photometrie durch ein höheres Maß an Selektivität aus.

Die Fluoreszenzfähigkeit einer Substanz wird im Wesentlichen durch ihre chemische Konstitution bestimmt. Die erste Voraussetzung ist die Fähigkeit zur Lichtabsorption. Vollkommen transparente oder reflektierende Materialien können kein Licht aufnehmen und sind somit nicht in der Lage zu fluoreszieren (ALALUF, 2001).

Moleküle, die delokalisierte π -Elektronensysteme besitzen, sind oftmals in der Lage zu fluoreszieren (WEHRY, 1990a). Diese treten vor allem in komplexen Molekülen mit konjugierten Doppelbindungen auf, in denen sich die relevanten Molekülorbitale über mehrere Atome erstrecken und zahlreiche vertikale Elektronenübergänge möglich sind. Treten Moleküle mit zahlreichen konjugierten Doppelbindungen auf, dann reicht bereits die Energie sichtbarer Strahlung zur Anregung aus (ALBANI, 2001).

Versuche, Regeln für die Fluoreszenzfähigkeit von Substanzen aufzustellen sind auf Grund ihrer komplexen Zusammenhänge zu der chemischen Konstitution der jeweiligen Verbindung schwierig. Bislang konnten für organische Substanzen lediglich gewisse Regelmäßigkeiten aufgezeigt werden (Förster, 1951; DANCKWORTT und EISENBRAND, 1964). Selbst wenn die oben genannten Kriterien erfüllt sind, ist nicht immer eine Fluoreszenz messbar. Sogenannte Prädissoziationseffekte (Trennungen von Bindungen während des Abklingens) können eine Fluoreszenzunfähigkeit einiger Moleküle zur Folge haben. Diese Prozesse können mit der schnellen Energieabgabe durch Lichtemission konkurrieren, da sie die Energie zunächst in chemische Energie und nicht direkt in Kernschwingungsenergie umändern. Die strahlungslose Deaktivierung der Anregungsenergie durch Prädissoziation hängt dabei von der Anregungsdauer des Moleküls und der dynamischen Wechselwirkung der zu trennenden Bindung und dem angeregten Elektronensystem im Molekül ab, in erster Linie jedoch von der Differenz zwischen der Anregungs- und der Trennungsenergie der schwächsten Bindung. Demzufolge sind aromatische Verbindungen im Allgemeinen fluoreszenzfähig, da sie eine große Bindungsfestigkeit bei geringer Anregungsenergie besitzen. Die Resonanz dieser Moleküle führt zu einer Stabilisierung des Bindungssystems und zu einem Ausgleich verschiedenartiger Bindungen, wodurch das schwach bindende π -Elektronensystem, welches die Lage des Anregungszustandes bestimmt, verstärkt wird.

Damit Fluoreszenz auftreten kann, darf die Struktur des Moleküls zudem keine strahlungslose Übergänge begünstigende strukturelle Einheiten oder funktionelle Gruppen beinhalten (SCHWEDT, 1981). Durch die Substitution gewisser Gruppen (z.B. $-I$, $-NO_2$, $-NH_3^+$), vor allem direkt am aromatischen Kern, kann die Fluoreszenzfähigkeit verloren gehen. Dies erklärt sich daraus, dass die Bindungen zu diesen Substituenten i.d.R. schwächer sind als zu den durch sie ersetzten Wasserstoffatomen. Nur wenn die Anregungsenergie zur Trennung der Substituenten-Bindungen nicht ausreicht, können auch langwellig absorbierende Moleküle fluoreszieren. Das Fluoreszenzvermögen kann bei kurzwellig absorbierenden und fluoreszierenden Substanzen durch einige Substituenten verstärkt beeinträchtigt werden. Allerdings kann das Nichtauftreten von Fluoreszenz nicht immer auf das Vorhandensein dieser Gruppen zurückgeführt werden. Besonders in den sogenannten Farbstoffen werden mehrere solcher Substituenten (i.d.R. aromatische

Reste) durch Verknüpfungen mit weiteren Atomen als Ring zusammengeschlossen. Infolge dieses Ring-schlusses werden diese Moleküle fluoreszenzfähig, was wohl in erster Linie darauf beruht, dass diese Bindung die ebene Atomanordnung mit delokalisierten Elektronen unterstützt. Allerdings können auch Moleküle fluoreszieren, in denen diese aromatischen Reste statt im Ring durch längere Atomketten verbunden sind, vor allem wenn sie sich in Lösungsmitteln hoher Viskosität befinden, die zum Erhalt der ebenen Atomanordnung auch im angeregten Zustand beitragen.

Mit Hilfe der Fluorimetrie lassen sich Substanzen in deutlich niedrigeren Konzentrationsbereichen detek-tieren, als es mittels photometrischer Analysen möglich wäre. Diese bis zu vier Zehnerpotenzen höhere Empfindlichkeit erklärt sich auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gl. 2.2.1) (SCHWEDT, 1981). Der Extinktionskoeffizient (ϵ) ist abhängig von der Wellenlänge (λ) des monochromatischen Lichts und gibt an, welcher Anteil der Photonen eines Lichtstrahls beim Durchlaufen einer Strecke (d) durch das in Lösung befindliche Molekül absorbiert wird.

$$E = \log(I_0/I) = \log(I_0/(I_0 - I_a)) = \epsilon(\lambda) * c * d \quad (\text{Gl. 2.2.1})$$

I = Strahlungsintensität nach der Absorption
 I_0 = Intensität der Strahlungsquelle
 I_a = absorbierter Lichtstrom
 $\epsilon(\lambda)$ = molarer Extinktionskoeffizient
 c = molare Konzentration
 d = Schichtdicke der Küvette

Die Extinktion oder auch Absorption (E) ist nicht proportional zur Intensität der Anregungsstrahlung (I_0). Die Empfindlichkeit der Absorptionsmessung lässt sich also nur bedingt durch eine Erhöhung der Lichtin-tensität steigern. Die Fluoreszenzintensität (F) nimmt hingegen durch den Einsatz stärkerer Lichtquellen zu. Demzufolge ist grundsätzlich eine erhöhte Sensibilität der Messung möglich (SCHULMANN, 1977 zit. in SCHWEDT, 1981).

$$F = 2,3 * \Phi_F * I_0 * \epsilon(\lambda) * c * d \quad (\text{G. 2.3})$$

Φ_F = Quantenausbeute
 I_0 = Intensität der Strahlungsquelle
 I_a = absorbierter Lichtstrom
 $\epsilon(\lambda)$ = molarer Extinktionskoeffizient
 c = molare Konzentration
 d = Schichtdicke der Küvette

Fluorophore zeichnen sich durch einen hohen Extinktionskoeffizienten (ϵ) aus. Der Energiebetrag zur Erreichung des angeregten Zustandes sollte jedoch möglichst gering sein, da hohe Energien in Verbindung mit niedrigen Extinktionskoeffizienten zu photochemischen Zersetzungen führen können. Für den Erhalt einer starken, d.h. analytisch gut verwertbaren Fluoreszenzemission, sollte die Quantenausbeute Φ_F der angeregten Substanz möglichst hoch sein. Die *Quantenausbeute* oder auch *Fluoreszenzausbeute* stellt hierbei den Anteil an der Gesamtzahl angeregter im Vergleich zur Anzahl fluoreszierender Moleküle dar. Sie variiert demzufolge zwischen 0 und 1.

Jede fluoreszierende Substanz weist ein spezifisches Anregungs- bzw. Absorptionsspektrum auf. Dabei handelt es sich um die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungswellenlänge bei fester Emissionswellenlänge. Auch das Emissions- bzw. Fluoreszenzspektrum, das bei einer festen Anregungswellenlänge gemessen wird, ist für jede Substanz charakteristisch. Dabei ist das emittierte Spektrum unabhängig von der absorbierten Wellenlänge, lediglich die Intensität der Fluoreszenzemission verändert sich. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Fluoreszenzspektren durch die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Wellenlänge dargestellt. Die Wellenlänge der absorbierten oder emittierten Strahlung entspricht dabei der Energiedifferenz, die das Molekül, bzw. das Elektron erfährt. Bei in Lösung oder direkt an der Probe gemessener Fluoreszenz werden in den Spektren sogenannte *Peaks* gemessen. Ein *Peak* stellt einen monotonen Anstieg der Fluoreszenzintensität zum Maximum dar, mit anschließendem monotonem Abfall im Bereich der längeren Wellenlängen.

Neben ihrer spezifischen Absorptions- und Emissionswellenlängen zeichnet sich die jeweilige fluoreszierende Substanz auch durch eine bestimmte Lebensdauer, beschrieben als die mittlere Lebensdauer (τ), im angeregten Zustand aus, die zwischen 0,1 ns bis 100 ns variieren kann. Sie definiert somit die durchschnittliche Zeit, die sich ein Molekül im angeregten Zustand befindet bei einem zu erwartenden exponentiellem Abfall der Fluoreszenzintensität nach dem Aussetzen der Lichtanregung (Gl. 2.2.2).

$$\tau = 1/k \quad (\text{Gl. 2.2.2})$$

k = summarische Konstante aller Deaktivierungsraten
(Fluoreszenz und strahlungsloser Zerfall)

Zu den fluoreszierenden organischen Verbindungen gehören in erster Linie die aromatischen Verbindungen, insbesondere die Kohlenwasserstoffe, und die heterocyclischen Verbindungen. Aber auch einige wenige nicht-aromatische Substanzen können Fluoreszenz emittieren. Obst- und Gemüseprodukte enthalten verschiedene fluoreszierende Inhaltsstoffe, wie beispielsweise Pigmente (z.B. Chlorophyll a und b), Vitamine (z.B. Riboflavin, Tocopherol), *NADPH*, phenolische Substanzen (z.B. Zimtsäurederivate, Flavonoide) und andere (MORALES et al. 1994, 1996, LICHTENTHALER et al., 1996; LANG et al., 1996; BUSCHMANN et al., 2000). Das aufgezeichnete Spektrum einer einzelnen Frucht setzt sich dabei aus den

vielen Einzelspektren der in der Probe fluoreszierenden Elemente zusammen, die charakteristische Intensitätsmaxima in bestimmten Wellenlängenbereichen aufweisen.

2.2.3 Fluoreszenzlöschung

Während des instabilen angeregten Zustandes S_1 können Störungen wie Rotationsvorgänge, Komplexbildungen oder Energieaustausche in das System eingreifen und somit das Fluoreszenzspektrum, die Fluoreszenzquantenausbeute und/oder die jeweilige Lebensdauer der Fluoreszenz eines Moleküls erheblich verändern bzw. die Fluoreszenzemission sogar ganz aufheben.

Die durch äußere Vorbedingungen beeinflussten Fluoreszenzveränderungen entstehen durch Wechselwirkung zwischen dem fluoreszierenden Molekül und einem weiteren Fremdstoff im System und werden als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Die Prozesse, die eine Abnahme der Fluoreszenz wegen einer anderen Energieabgabe als der Fluoreszenzstrahlung bei der Rückkehr vom angeregten S_1 -Zustand in den S_0 -Grundzustand zur Folge haben, werden *dynamisches Quenching* oder *dynamische Fluoreszenzlöschung* genannt. Es handelt sich hierbei um einen Energieaustausch zwischen dem fluoreszenzfähigen, angeregten Molekül und einem sogenannten Quencher, der erstgenanntem die Anregungsenergie entzieht, ohne dabei das fluoreszierende Molekül selbst zu verändern. Das Eingreifen des Löschvorgangs geschieht dabei vorrangig an Molekülen längerer Anregungsdauer, so dass durch das dynamische Quenching die mittlere Fluoreszenzabklingdauer verkürzt wird, welche proportional zur Quantenausbeute abnimmt. Gleichzeitig erhöht sich durch die geringere Rotationsdepolarisation die Fluoreszenzpolarisation. Die Fluoreszenzpolarisation hängt dabei von der Rotationsbewegung der Moleküle während der Anregungsdauer ab. Die Absorption bleibt aufgrund der Nichtveränderung des fluoreszierenden Moleküls jedoch die gleiche. Die Vorgänge, die bereits im Grundzustand zu Veränderungen durch lockere Molekülverbindungen führen und somit zur Fluoreszenzunfähigkeit oder eingeschränkter Quantenausbeute, werden als *statisches Quenching* bezeichnet. Im Unterschied zur dynamischen Fluoreszenzlöschung bleiben die Abklingdauer und Polarisation der Fluoreszenz unverändert (FÖRSTER, 1951). Jedoch können solche Komplexbildungen durch ein verändertes Absorptionsverhalten gegenüber des ungebundenen Moleküls in Erscheinung treten. Die statische Fluoreszenzlöschung zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass nach der lockeren Verbindung im Grundzustand das Molekül im angeregten Zustand nicht weiter verändert wird. Oftmals treten beide Formen der Fluoreszenzlöschung parallel auf oder es kommt zu sogenannten Übergängen, wenn dynamische Veränderungen nach Komplexbildung im angeregten Zustand des Moleküls eingreifen (FÖRSTER, 1951; ALBANI, 2001).

Das zu detektierende fluoreszierende Molekül befindet sich in der Regel in einer Umgebung, in der andere Moleküle oder weitere Faktoren auf es einwirken können. Dies trifft sowohl für Messungen beispielsweise ganzer Früchte, als auch für Messungen von Reinsubstanzen in Lösung zu. Die wesentlichen äußeren Faktoren, die bei der Störung des Systems eine entscheidende Rolle spielen sind:

- (i) die Temperatur der Probe bzw. in Lösung,
- (ii) das Lösungsmittels und dessen Polarität, wobei hierbei beispielsweise innere Zellregionen zu den Lösungsmitteln gezählt werden,
- (iii) und der *pH*-Wert des Mediums.

Die Temperatur ist ein entscheidender Faktor bei der Analyse von Fluoreszenzspektren (FÖRTSER, 1951; GUILBAULT, 1990). Mit zunehmender Temperatur nehmen die Deaktivierungsmöglichkeiten der Moleküle im angeregten Zustand zu, was zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt. Nach HERCULES (vgl. SCHWEDT, 1981) liegt der Temperaturkoeffizient, abhängig von der jeweiligen fluoreszierenden Substanz, bei 1 bis 1,2 relativer Fluoreszenzintensität je 10 K Temperaturveränderung. Infolge der Zunahme der strahlungslosen Prozesse im System verringern sich die Quantenausbeute und die Fluoreszenzabklingdauer. Zudem werden bei ansteigender Temperatur sowohl die einzelnen Banden als auch das ganze Spektrum verbreitert. Temperaturschwankungen während der Messung sollten daher vermieden werden und müssen vor allem in der analytisch quantitativen Auswertung berücksichtigt werden. Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei abnehmender Temperatur konnte auch *in vivo* für die Chlorophyllfluoreszenz in Blättern nachgewiesen werden (AGATI, 1998).

Das Lösungsmittel beeinflusst vor allem, aber nicht ausschließlich, durch seine Zähigkeit die Fluoreszenzemission. Mit ansteigender Lösungsmittelzähigkeit nimmt die Fluoreszenzlöschung zu. Ein unmittelbarer Einfluss ergibt sich zudem aus der Ionenkonzentration der Lösung. Darüber hinaus führt die Polarität der Lösungsmittelmoleküle zu einer Polarisierung, infolgedessen es zu einer spektralen Verschiebung sowohl der Absorptions- als auch der Fluoreszenzmaxima kommen kann (ALBANI, 2001). Die Fluoreszenzpolarisation wird in hinreichend zäher Lösung depolarisiert, da die Rotationsbewegung der Moleküle während der Anregungsdauer in zähen Lösungsmitteln langsamer verläuft als in weniger zähen. Die Polarisierung der Fluoreszenz wird jedoch nicht nur durch die Lösungsmittelzähigkeit beeinflusst, sondern auch von der Fluoreszenzabklingdauer, die wiederum lösungsmittelabhängig ist. Weiterhin kann es in Lösungen zur Bildung von Wasserstoffbrücken kommen, die eine Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität bewirken (SCHWEDT, 1981; GUILBAULT, 1990).

Veränderungen im *pH*-Wert der Lösung beeinflussen meist sowohl das Absorptions- als auch das Fluoreszenzemissionsspektrum (ALBANI, 2001), da es hierbei zu Anlagerung oder Abspaltung von Protonen an der fluoreszierenden Substanz schon vor der Anregung kommen kann. Bei manchen Fluorophoren gehen keine Absorptionsveränderungen mit dem Fluoreszenzumschlag durch *pH*-Wert-Verschiebung einher, letzterer entsteht durch Dissoziation im angeregten Zustand (WEHRY, 1990b).

Die genannten Einflüsse und Fluoreszenzlöschungseffekte setzen direkt am Fluorophor oder im zu messenden Medium an. Darüber hinaus ist bei der Messung und Auswertung von Fluoreszenzspektren aber auch zu beachten, dass das zu absorbierende Licht das fluoreszierende Molekül zunächst erreichen muss, bevor eine Energieaufnahme möglich ist. Hier kann es bei komplexen Systemen, z.B. Früchten, die aus vielen Inhaltsstoffen bestehen, zu konkurrierenden Effekten der strahlungsabsorbierenden Moleküle kommen. Generell bleibt zu berücksichtigen, dass durch Reabsorption von emittierter Fluoreszenz durch weitere Moleküle in Lösung bzw. im Medium das zu messende Fluoreszenzspektrum zu Gunsten der längeren Wellenlängen verlagert wird, da sich die Fluoreszenzemission immer an die langwelligere Grenze des Absorptionsspektrums anschließt. Die kurzwelligen Emissionen können also auf dem Weg zum Punkt, an dem das Messsignal abgegriffen wird (z.B. Messsonde an der Oberfläche der Frucht), stärker absorbiert werden.

2.2.4 Messtechnik

Es werden derzeit unterschiedlichste Analysemethoden in der Fluorimetrie erfolgreich eingesetzt. Um die Vor- und Nachteile der bislang eingesetzten Methoden für die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie an Gartenbauprodukten beurteilen zu können, sollen im Folgenden die einzelnen Gerätebestandteile näher erläutert werden.

Ein für die Fluoreszenzspektroskopie konzipiertes Messgerät besteht im Wesentlichen aus vier Bestandteilen:

- (1) die Lichtquelle,
- (2) der Filter,
- (3) die Messküvette und
- (4) der Detektor.

Am Ende steht ein Konverter, der das detektierte Signal in Form von analogen oder digitalen Daten zur weiteren Verarbeitung überträgt.

Die *Lichtquelle* regt das Elektron des fluoreszierenden Moleküls mit der nötigen Energie an, um in den angeregten Singulett-Zustand S_1 übergehen zu können. Dabei gilt das auf die Fluoreszenz angewendete und umgewandelte Lambert-Beersche Gesetz. Es macht deutlich, dass die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Intensität der angeregten Strahlung ist. Somit wird durch eine innerhalb bestimmter Grenzen liegende Erhöhung der Strahlungsintensität der Lichtquelle die Intensität des Fluoreszenzsignals

erhöht. Durch den Einsatz von Lasern ist es bspw. möglich spurenanalytische Bestimmungen durchzuführen bzw. auch nur geringe Mengen fluoreszierender Inhaltstoffe in den Proben anzuregen und zu messen. Demnach ist eine konstante Lichtquelle eine zwingende Voraussetzung für genaue Messungen der Fluoreszenz. Bei Intensitätsschwankungen kann zur anschließenden Messkorrektur ein Teil des erregenden Lichtstroms abgezweigt und einem zweiten Strahlungsmesser zugeführt werden. In FROELICH und GUILBAULT (1990) sind die Vor- und Nachteile der einzelnen Lichtquellen erklärt.

Für die Wellenlängenselektion werden unterschiedliche Filter (in Filterfluorimetern) oder Monochromatoren eingesetzt. Filterfluorimeter werden vor allem in Verbindung mit Trennmethode(n) (z.B. Flüssigkeits-Chromatographie) angewendet, während Gerätetypen mit Monochromatoren zur Analyse von komplexen Proben mit mehreren fluoreszierenden Inhaltsstoffen, wie bspw. Obst- und Gemüseprodukte eingesetzt werden können. Der Monochromator dient dabei als Filter für die Selektion von Anregungs- und/oder Emissionswellenlängen, d.h. dass das ankommende Licht in seine Wellenlängenbestandteile zerlegt werden kann. Monochromatoren sind i.d.R. Beugungsgitter und keine Prismen. Der Einsatz von Doppelgitter bei den Anregungsmonochromatoren dient dabei der Minimierung von Streulicht. Geräte mit von einander unabhängigen Gittermonochromatoren ermöglichen sowohl die Aufnahme von Anregungs- als auch von Emissionsspektren. Die Spaltbreiten hinter dem Anregungs- bzw. vor dem Emissionsmonochromator bestimmen das Auflösungsvermögen des Gerätes: mit geringerer Spaltbreite nimmt die Selektivität zu, aber gleichzeitig die Sensitivität ab, da die Lichtintensität verringert wird. Die Bandbreite der zu messenden Signale wird durch die Monochromatoren und ihre Spaltbreiten bestimmt. Der zusätzliche Einsatz optischer Filter dient dem Ausschluss von Streulicht, das den Monochromator passieren kann.

Ein wesentlicher Nachteil von Monochromatoren ist, dass ihre Effizienz wellenlängen- und polarisationsabhängig ist. Zudem besteht eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Auswahl der Wellenlänge, was eine regelmäßige Rekalibrierung des Spektrometers erfordert. Also werden als Wellenlängenselektoren zunehmend auch akusto-optisch durchstimbare Filter (*acousto-optic tunable filter, AOTF*) eingesetzt (CAMPIGLIA et al., 1997; GEORGE und PATONAY, 1997; INOUE und PEÑUELAS, 2001; BECKER et al., 2004). Ein *AOTF* basiert auf der Interaktion zwischen optischer Strahlung und akustischer Welle in einem anisotropen Medium. Der Vorteil eines *AOTF* liegt in seinem leichten Aufbau, so dass er sich hervorragend für tragbare Geräte eignet. Geräte mit mechanisch operierenden Wellenlängenselektoren sind im Gegensatz dazu meist sperriger, schwerer und Messfehler durch bspw. umfeldbedingte Vibrationen sind wahrscheinlicher (CAMPIGLIA et al., 1997; GEORGE und PATONAY, 1997).

Faseroptische Sonden bzw. Lichtwellenleiter werden in der Fluoreszenzspektroskopie bei manchen Geräten eingesetzt, um das Anregungslicht von der Lichtquelle über eine längere Distanz (z.B. 3 m) zur Probe bzw. zum Messort zu transportieren. Diese Sonden bestehen i.d.R. aus Glasfasern oder auch Kunststoffen. Früher wurden noch ganze Glasfaserbündel eingesetzt, heute reicht hingegen bereits je eine Faser für die Hin- und die Rückleitung aus.

Die Ausrichtung der Anregungsstrahlung zur Detektion der Emissionsstrahlung ist abhängig vom jeweiligen Aufbau des Gerätes. Da das Fluoreszenzlicht unabhängig von der Position der Lichtquelle in alle Richtungen emittiert, kann die Detektion in einem beliebigen Winkel zur Anregungsquelle erfolgen. Die 90°-Stellung der Detektionssonde zum einfallenden Lichtstrahl empfiehlt sich in erster Linie für den Fall der geringen Absorption durch die fluoreszierenden Substanzen. Hierbei kann das im inneren der Messküvette bzw. der Probe gestreute Licht durch den Einsatz von komplementären Filtern ausgeschaltet werden. Bei longitudinaler Messung (180°-Stellung) an der Rückseite der Messzelle, sollte das Anregungslicht in jedem Fall herausgefiltert werden. Dieser Aufbau eignet sich für den Fall einer starken Absorption der fluoreszenzfähigen Substanz und einer geringen Absorption der emittierten Fluoreszenzemission durch weitere Moleküle im Medium. Tritt jedoch zusätzlich eine starke Absorption des Fluoreszenzlichtes in der Messküvette bzw. der Probe auf, dann sollte die Messung an der Oberfläche der Einstrahlungsrichtung erfolgen (0°-Stellung) und das hierbei an der Oberfläche reflektierte Licht durch komplementäre Filter ausgeblendet werden. Bei Messungen von ganzen Proben (z.B. Früchten) werden die Emissionssignale direkt an der Probenoberfläche im 0°-Winkel zur Anregungsrichtung detektiert, ohne den Einsatz von Messzellen (FÖRTSER, 1951).

Als Strahlungsempfänger bzw. Detektoren werden Photomultiplier (*PMT*) eingesetzt, die die als Fluoreszenzstrahlung abgegebene Energie der aus dem Singulett-Zustand (S_1) in den Grundzustand (S_0) zurückfallenden angeregten Elektronen detektieren. Diese Detektoren werden aufgrund ihrer hohen Sensitivität vor allem zur Ermittlung geringer Intensitäten eingesetzt. Ein Photomultiplier setzt sich zusammen aus einer Photokathode, die die Lichtquanten durch den Photoeffekt in Photoelektronen umwandelt, und einem Sekundärelektronenvervielfacher. Letzterer verstärkt die Photoelektronen mittels mehrerer aufeinander folgenden Dynoden. Dabei werden die von der Photokathode emittierten Elektronen durch ein elektrisches Feld auf die erste Dynode beschleunigt, wo sie eine Anzahl von Sekundärelektronen erzeugen, die dann wiederum zur nächsten Dynode hin beschleunigt werden. Dieser Kaskadeneffekt kann bis zu 10^7 Elektronen für jedes auf die Photokathode auftreffende Photon kreieren, abhängig von der Anzahl der Dynoden und der Beschleunigung. Am Ende werden die Elektronen auf einer Anode gesammelt, von der man das entstehende Signal abgreifen kann. Zum Aufbau der Beschleunigungsstrecke müssen Photokathode, Dynoden und Anode auf stetig ansteigende Potentiale gelegt werden (SCHWEDT, 1981; FROELICH und GUILBAULT, 1990)

Die Auswahl der Photokathode ist von entscheidender Bedeutung für die Effizienz und die Sensitivität des Photomultipliers. Sie darf nicht zu dick sein, sonst werden weniger Elektronen emittiert als Photonen absorbiert. Ist die Photokathode zu dünn, können die Photonen ohne Absorption passieren. Ihre chemische Konstitution bestimmt darüber hinaus den messbaren spektralen Bereich. Ein wesentlicher Nachteil der Photomultiplier ist ihre Empfindlichkeit gegenüber der Umgebungstemperatur. Schon beim Einsatz und längerer Lagerung bei Raumtemperatur kann es zu Schwankungen der Sensitivität höchstwahrscheinlich durch die Bewegung von Alkali-Elementen kommen, die die Photokathode und die Dynodenoberflächen aktivieren.

Eine weitere Möglichkeit sich das Phänomen der Fluoreszenz mittels Messtechniken zu Nutze zu machen, ist die Messungen der Lebensdauern bzw. Abklingkurven der angeregten Moleküle (BRODY, 2002; BRIGHT und MUNSON, 2003). Sie bietet die Möglichkeit, Informationen über die Stoßfrequenz der Stöße mit Quenchern, die Geschwindigkeit eines Energietransfers oder die Geschwindigkeit von Reaktionen, die im angeregten Zustand stattfinden können, zu erhalten. Sie erfordert jedoch auch sehr schnelle Geräte und Detektoren, da sich die Fluoreszenzlebenszeiten im Nanosekundenbereich abspielen. Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit in einem variablen Wellenlängenbereich die Intensität des Emissionsspektrums in einem bestimmten Zeitor (z.B. innerhalb von 2 ns) nach einer definierten Zeit nach dem Anregungspuls zu detektieren. Mit Hilfe der Fluoreszenzmessung bei unterschiedlichen Zeittoreinstellungen können in einigen Fällen sich überlagernde Fluoreszenzsignale getrennt werden (ZUDE, 2004).

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Fluoreszenzanalyse an Obst- und Gemüseprodukten wurde mit Hilfe eines laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers gemessen. Der Laser als Lichtquelle wurde aufgrund seiner hohen Anregungsintensität ausgewählt, um auch geringe Gehalte einzelner Polyphenole in den Früchten erfassen zu können. Die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzspektren ermöglichte die Fluoreszenzanalyse mit unterschiedlichen Zeittoreinstellungen, um auf die spezifischen fluorimetrischen Eigenschaften der unterschiedlichen Produkte eingehen zu können. Mit Hilfe des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers konnten Fluoreszenzspektren in einem Wellenlängenbereich von über 350 nm bis 820 nm aufgezeichnet werden.

Außerdem wurde die spektrale Fluoreszenzanalyse in einem Bereich von 200 nm bis 800 nm ausgewählt, um mit den Anregungswellenlängen ab 200 nm den Absorptionsbereichen einiger der in der vorliegenden Arbeit untersuchten phenolischen Substanzen besser entsprechen zu können. Ergänzend aufgezeichnete Fluoreszenzanregungsspektren an Lösungen und an Früchten sollten für die Beurteilung von Fluoreszenzlöschungs- und Reabsorptionseffekten eingesetzt werden.

2.3 Chemometrie

In den gemessenen Fluoreszenzspektren der Früchte sind neben den zu ermittelnden Angaben (z.B. Polyphenolgehalt) auch weitere Informationen enthalten. Inhomogenes Probenmaterial, Lichtstreuungseffekte und Geräteungenauigkeiten führen ebenfalls zu Variationen bzw. Varianz in den Spektren. Die Beziehung, die zwischen den spektralen Intensitäten und dem Fluorophorgehalt existiert wird somit von zahlreichen Einflussfaktoren überlagert. Die Variablen sollten dabei nicht isoliert (univariat) voneinander betrachtet werden, sondern das Zusammenwirken mehrerer Variablen sollte simultan in die Bewertung mit einbezogen werden. Mit Hilfe multivariater Auswerteverfahren ist es möglich, Aussagen über ein bestimmtes Qualitätsmerkmal der Früchte aus dem spektralen Datensatz zu extrahieren (BRO et al., 2002; GELADI, 2002). Dabei wird ein Zusammenhang zwischen unabhängigen (hier: spektralen) Messgrößen und abhängigen Eigenschaften (z.B. die Konzentration) einer Substanz in einer Probe ermittelt.

Die Anzahl der gemessenen Spektren wird in der Regel in einer Matrix $X_{n \times m}$ dargestellt, mit n Objekten (z.B. Früchte) und m Variablen (z.B. Wellenlängen). Die abhängigen Eigenschaften werden entsprechend in einer Matrix Y zusammengefasst, wenn es sich um mehrere Parameter handelt, und in einem Spaltenvektor y , wenn es nur eine einzige Einflussgröße ist.

Signalvorverarbeitungsmethoden werden in diesem Zusammenhang eingesetzt, um das Rauschen in den Spektren zu reduzieren oder Basislinienverschiebungen zu korrigieren (SHARAF et al., 1986; SUNDBERG, 1999; PEIRS, 2002; GELADI, 2002; WISE et al., 2003; ZEAITER et al., 2005). Darüber hinaus dienen die Datenvorverarbeitungsmethoden der Reduktion der Komplexität des Datensatzes, indem sie die Anzahl unerwünschter Variablen minimieren und somit die inhaltsstoffbedingten Unterschiede der Proben betonen (JOUAN-RIMBAUD et al., 1995a; Geladi, 2002; Luypaert et al., 2002).

2.3.1 Hauptkomponentenanalyse

Das Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es, mit Hilfe von graphischen Darstellungen die Untersuchung von Beziehungen oder Ähnlichkeiten zwischen Objekten eines multivariaten Datensatzes zu ermöglichen (WOLD, 1987; JACKSON, 1981; WISE et al., 2003; REICH, 2005). Als Ausgangsbasis dient die Rohdatenmatrix X der Dimension $(n \times m)$, bestehend aus n Zeilen verschiedener Objekte und m Spalten verschiedener Variablen (z.B. Wellenlängen). Spektrale Daten sind oftmals korreliert, was zu instabilen Modellparametern führt. Um diese Korrelation zu minimieren, werden einige wenige, die Varianz der Daten bestimmende Hauptkomponenten (*principal components*, *PC*) herausgearbeitet. Sie stellen gewichtete Linearkombinationen der Variablen dar. Es wird eine Transformationsmatrix berechnet, die aus den Eigenvektoren der Kovarianzmatrix bzw. der Korrelationsmatrix besteht und die die Daten in einen Vektorraum mit einer neuen Basis überführt. Hierfür wird ein neues, rotiertes Koordinatensystem in die n -dimensionalen Daten gelegt, so dass die erste Achse durch die Punktwolke die maximale Varianz dieser Daten beschreibt, die zweite, hierzu orthogonal, die zweitgrößte Varianz erklärt bis hin zur n -ten zueinan-

der senkrecht stehenden Achse. Die ersten Achsen decken den größten Prozentsatz der Gesamtvarianz ab und werden als Faktoren für die Hauptkomponentenanalyse ausgewählt. Die *PC* mit dem geringsten Anteil an Varianz erklären in der Regel lediglich die Rauscheffekte des Datensatzes, was keinen Komponenten zugeordnet werden konnte ist in der Matrix der *Residuen* erfasst (Gl. 2.3.1).

$$X = TP' + \text{Residuen} \quad (\text{Gl. 2.3.1})$$

Die Koordinaten der in das neue System projizierten Daten werden in der *Scores*-Matrix (*T*) zusammengefasst und enthalten Informationen über den Zusammenhang der einzelnen Objekte untereinander. Die Bedeutung der einzelnen Variablen zueinander und die Richtungen der Variationen im Datensatz werden durch die *Loading*-Matrix (*P*) beschrieben (BÜNTIG, 1999; FROST, 2000). Dabei stellen die einzelnen *Loadings* den Cosinus des Winkels zwischen der jeweiligen Variablen und der entsprechenden Hauptkomponenten dar und können demnach zwischen -1 und 1 variieren (BOUVERESSE und ZUDE, Laborskript (unveröffentlicht), persönliche Mitteilung). Im Anschluss an die *PCA* ist eine Hauptkomponentenregression (*principal component regression*, *PCR*) möglich, um anhand der ermittelten Hauptkomponenten (*T*-Matrix) die Korrelation mit einer abhängigen Variablen *y* zu ermitteln.

Für die Aussagefähigkeit der Hauptkomponentenanalyse ist es entscheidend, die optimale Anzahl der Hauptkomponenten (*PC*) zu bestimmen, die in das Modell einfließen sollen (WISE und GALLAGHER, 1998; BÜNTIG, 1999). Als Auswahlkriterium wird jeder Hauptkomponente eine prozentuale Varianz zugeordnet und es fließen nur diejenigen Komponenten in das Modell ein, die einzeln mehr als 2% dieser Varianz erklären. Dabei ist zu beachten, dass die gewählte Anzahl an Variablen einen bestimmten Anteil an Varianz erklärt, da der übrige Anteil als für das System nicht relevant betrachtet wird. Ein weiteres Entscheidungskriterium liefert die Darstellung der Eigenwerte in Abhängigkeit der Hauptkomponenten. Die optimale Anzahl an *PC* wird dort angesetzt, wo die stark abnehmende Kurve in ein sanft abfallendes Plateau übergeht. Die *Loadings* lassen darüber hinaus weitere Aussagen zu, ob es sich bei den jeweiligen Komponenten um systembeschreibende Variablen handelt oder bspw. um gerätebedingte Rauscheffekte.

2.3.2 Partial least squares Regression

Kalibrierung

Eine der überwiegend in der Chemometrie verwendeten Regressionsmethoden zur Kalibrierung ist die *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse (GELADI und KOWALSKI, 1986; HAALAND und THOMAS, 1988; OTTO, 1997; MARTENS und NAES, 1998; Wold et al., 2001; ABDI, 2003). Bei dieser Methode werden mit Hilfe einer faktoriellen Zerlegung der spektralen Datenmatrix den Daten gemeinsame Faktoren zugeordnet, die nicht direkt messbare Eigenschaften der Proben beschreiben. Die Faktorenzahl ist meist deutlich geringer als die Anzahl der Rohdaten. Im Gegensatz zur Hauptkomponentenregression (*PCR*)

werden hierbei jedoch nicht nur die Ausgangsdaten X mit einer möglichst großen Varianz, sondern zusätzlich auch die Zielgröße y mit einer maximierten Kovarianz zu X in die Berechnung einbezogen. Hierbei werden latente Variablen (LV) gebildet. So können neben bspw. Rauscheffekten auch unbekannte Einflussgrößen aus dem Kalibriermodell ausgeschlossen werden, die für die Analyse der Zielgröße nicht relevant sind. Die multivariate Kalibrierung zielt bei durch das Kalibriermodell charakterisiertem Zusammenhang auf die Vorhersage der Variablen y durch die Datenmatrix X ab (Gl. 2.3.2).

$$y = BX + \text{Residuen} \quad (\text{Gl. 2.3.2})$$

Die Bestimmung der Koeffizientenmatrix B stellt die Aufgabe der multivariaten Regression dar. In den Residuen ist der Varianzanteil enthalten, der durch das lineare Modell nicht erfasst werden konnte. Im Vergleich zur Hauptkomponentenanalyse definiert sich die PLS Regression neben der *Scores*-Matrix (T) und der *Loadings*-Matrix (P) zusätzlich durch die *Loading Weights*-Matrix (W), die die Kovarianz zwischen X und y maximiert. W und T stehen orthogonal zueinander. Der Prozess der PLS Regression ist iterativ, so dass T , P und W schrittweise ermittelt werden. Dabei wurde der *SIMPLS* Algorithmus angewendet, der etwas schneller als der traditionelle *NIPALS* Algorithmus ist. *SIMPLS* ist geringfügig besser, da es das Kovarianz-Kriterium maximiert. Sie unterscheiden sich zudem darin, dass bei *SIMPLS* die X -Block-*Scores* orthonormal und die *Loadings* nicht normiert sind, während die *Scores* bei *NIPALS* orthogonal und die *Loadings* normiert sind (WISE und GALLAGHER, 1998). Bei einem univariaten y -Datensatz ergeben beide exakt dieselben Ergebnisse (DE JONG, 1993).

Validierung

Das Ziel bei der Auswahl der Anzahl an latenten Variablen für die PLS Regression besteht in der Erarbeitung möglichst robuster Kalibriermodelle, so dass in der Regel hinsichtlich der geringeren Störanfälligkeit der Kalibrierung auf einen Anteil der Informationen zugunsten einer möglichst geringen Anzahl an LV verzichtet wird (WISE und GALLAGHER, 1998; BOUVERESSE und ZUDE, Laborskript (unveröffentlicht), persönliche Mitteilung). Zu wenig LV ergeben weniger komplexe Modelle, führen aber gleichzeitig zu *underfitting* (Abb. 2.3.1), da ein Teil der relevanten Information zur vollständigen Beschreibung der Proben ausgeschlossen wurde. Hingegen kommt es zu *overfitting* bei der Auswahl zu vieler Faktoren, die zu einem Anstieg der statistischen Unsicherheit in der Kalibrierung führen können (BÜNTING, 1999; FROST, 2000).

Die Qualität eines Modells wird durch sein Bestimmtheitsmaß (r^2_c) für den Kalibrierdatensatz, die benötigte Anzahl latenter Variablen und die Höhe des Kalibrierfehlers ($rmsec$) bestimmt. Der Fehler der Kalibrierung (Gl. 2.3.3) lässt Aussagen darüber zu, wie gut die Daten das Kalibriermodell erklären, jedoch spiegelt er meist einen zu kleinen Analysefehler wieder, ist anfällig für *overfitting* und somit nur bedingt aussagekräftig für die Beurteilung der Vorhersagequalität eines Modells.

$$rmsec = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred\ i} - y_i)^2}{n}} \quad (Gl. 2.3.3)$$

y_{pred} : vorhergesagter y-Wert

y : gemessener y-Wert

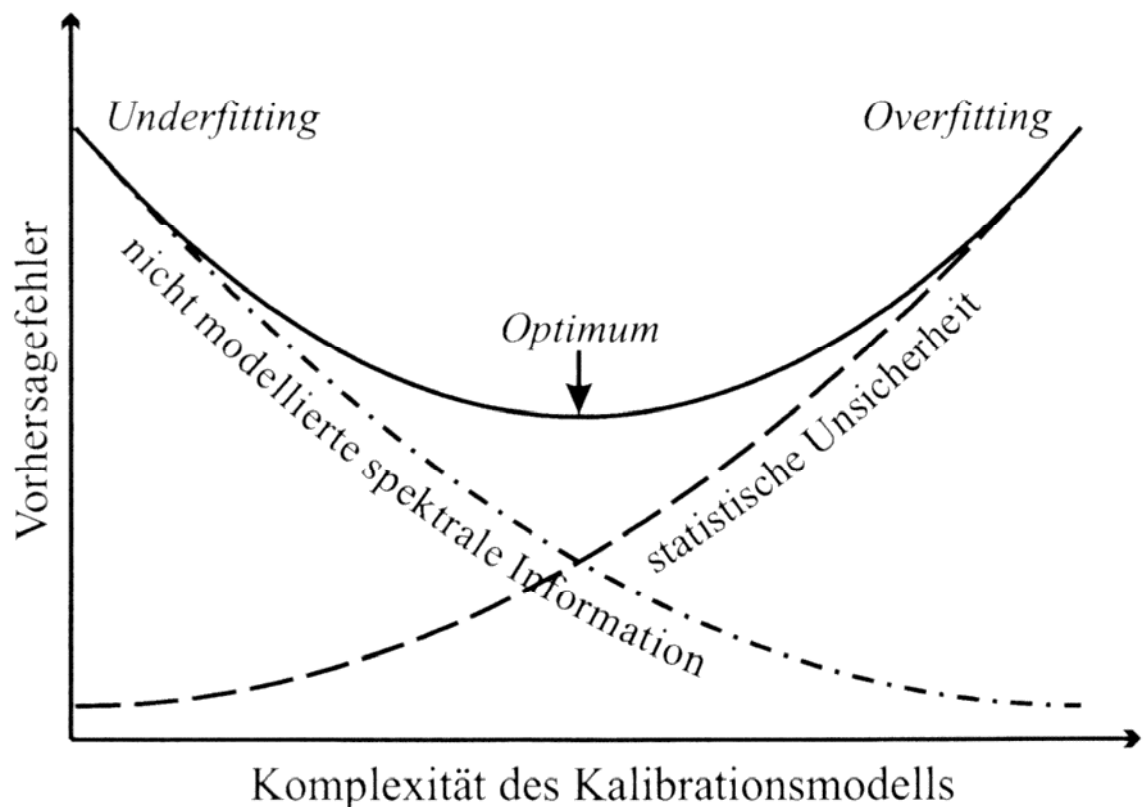


Abb. 2.3.1: Abhängigkeit des Fehlers von der Komplexität des Kalibrierfaktors (FROST, 2000).

Um die optimale Anzahl LV bestimmen zu können, wird der Fehler in der Kreuzvalidierung ($rmsecv$) oder der Fehler in der Validierung ($rmsep$) ermittelt. Für die Kreuzvalidierung (*cross validation*, CV) wird der Kalibrierungsdatensatz in Teilmengen unterteilt. Es wird dann fortlaufend jeweils eine dieser Gruppe bei der Modellierung ausgelassen und zur Vorhersage verwendet während auf dem restlichen Datensatz die Kalibrierung aufgebaut wird. Aus jeder dieser Kalibrierungen wird ein Vorhersagefehler errechnet, die Qualität der ausgewählten Anzahl an latenter Variablen wird durch die Summe aller dieser Fehler ausgedrückt. Am Ende wird das Kalibriermodell mit dem gesamten Datensatz auf der Basis der ausgewählten LV errechnet und der Fehler in der Kreuzvalidierung ($rmsecv$) zur Validierung des Modells herangezogen. Trägt man den $rmsecv$ -Wert gegen die Anzahl latenter Variablen auf, kann mit Hilfe der graphischen Dar-

stellung die optimale Anzahl an dem Punkt ermittelt werden, wo die *rmsecv*-Kurve ihren ersten Minimalwert erreicht. In der tabellarischen Auflistung werden die Faktoren entsprechend mit abnehmender Höhe der erklärten Kovarianz dargestellt. Im Zweifelsfall, wenn das Minimum nicht eindeutig bestimmbar ist, sollte das Modell mit der geringeren Anzahl an *LV* ausgewählt werden. Darüber hinaus sollten keine Faktoren, die weniger als 2 % der Varianz erklären mit einfließen. Für den Fehler in der Validierung wird hingegen das erarbeitete Modell der Kalibrierung auf einem unabhängiger Datensatz (*Test-Set*) angewendet und dessen Vorhersagefehler (Gl. 2.3.4) ermittelt. Die *Test-Set*-Validierung stellt die geeignetere Methode der Validierung des erarbeiteten Kalibriermodells dar (SUNDBERG, 1999; KOZAK und KOZAK, 2003). In der gartenbaulichen Praxis wird jedoch meist aus Kosten- und Zeitgründen oder Mangels der Verfügbarkeit saisonaler Produkte zugunsten der Kreuzvalidierung darauf verzichtet.

$$rmsep = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred\ i} - y_{test\ i})^2}{n}} \quad (\text{Gl. 2.3.4})$$

y_{test} : gemessener y -Wert des test-sets

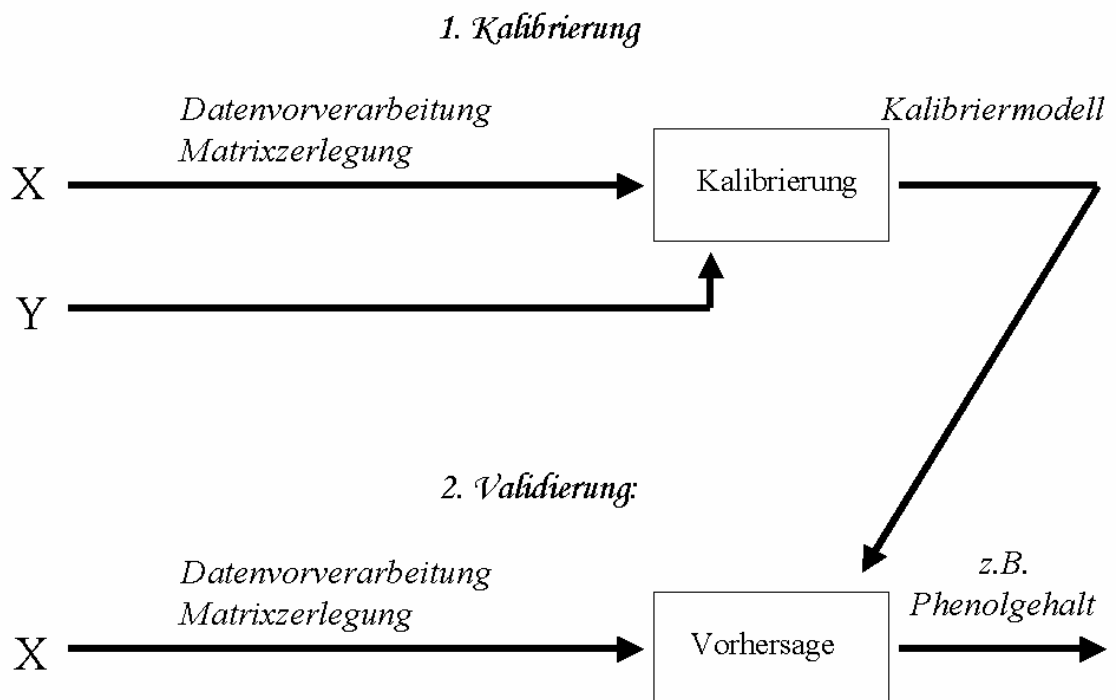


Abb. 2.3.2: Der Kalibrierungs- und Validierungszyklus (vgl. BÜNTING, 1999).

In Abb. 2.3.2 ist der Kalibrierungs- und Validierungszyklus für die *partial least squares* (PLS) Regressionsanalyse schematisch dargestellt.

2.3.3 Spezielle Vorverarbeitungsmethoden

Signalvorverarbeitung

Glättung

Durch das Geräterauschen bedingte Intensitätsschwankungen in spektralen Datensätzen können mit Hilfe der Glättung entlang der Wellenlängenachse reduziert werden. Eine Möglichkeit der Glättung stellt der gleitende Mittelwert dar. Hierbei werden die gemessenen Daten an jedem einzelnen Datenpunkt durch den Durchschnitt seiner umliegenden Datenpunkte ersetzt. Das ausgewählte Rechenfenster von bspw. sieben Werten wird dann Schritt für Schritt über die Datenreihe bewegt und der jeweilige Mittelwert errechnet.

Die Durchführung einer lokalen polynominalen Regression dient ebenfalls dazu, die geglätteten Werte für jeden Datenpunkt zu bestimmen. Dieser sogenannte Savitzky-Golay-Algorithmus basiert auf einer Polynomianpassung über $2n+1$ Stützstellen ($n \geq$ Ordnung des Polynoms) inklusive dem zu glättenden Punkt. Während bei der Filterung mittels gleitenden Mittelwert Datenmerkmale wie Impulshöhe und -breite ausgewaschen werden können, werden sie bei einer Savitzky-Golay-Glättung weitgehend erhalten (SAVITZKY und GOLAY, 1964).

Derivativbildung

Die Bildung einer Ableitung über das Spektrum dient in erster Linie dem Ausgleichen von parallelen horizontalen Verschiebungen (z.B. Basislinienverschiebung) bzw. der Korrektur additiver und multiplikativer Effekte. Sie bietet zudem die Möglichkeit sich überlagernde Scheitelpunkte zu trennen, da sie die feinen Banden vor dem Hintergrund breiter, sich überlappender Bereiche in den Spektren betont. In der ersten Ableitung werden die Maxima des Originalspektrums zu Nullstellen. Häufig wird jedoch die zweite Ableitung verwendet. Bei der zweiten Ableitung liegen die interessanten Banden wieder an den Wellenlängen des Originalspektrums. Höhere Ableitungen führen zunehmend zum Verstärken von Rauscheffekten. Aber auch eine Ableitung zweiter Ordnung kann bei stark verrauschten Signalen bereits das Rauschen erhöhen und somit die interessierenden Variationen im Datensatz zunehmend verdecken.

Normierung

Das Subtrahieren des Mittelwertes (m_p) von dem jeweiligen Datenwert der Probe (x) wird als Mittelwertzentrieren über die Proben (MZ_p) bezeichnet (Gl. 2.3.5). Dabei wird eine Art „Idealspektrum“ erstellt und die Abweichungen in den gemessenen Einzelspektren je Wellenlänge ermittelt. Die Daten variieren dem-

zufolge um den Mittelwert und der Schwerpunkt des Datenraums wird zum Ursprung verschoben, so dass die Daten im Hinblick auf ihre Abweichung um den Mittelwert interpretierbar werden.

$$x_{MZP} = x - m_P \quad (\text{Gl. 2.3.5})$$

Man unterscheidet zwischen der Mittelwertzentrierung über die Anzahl der Proben (MZ_P) und über die der Variablen (MZ_λ). Bei letzterem wird das gesamte Spektrum um den Mittelwert verschoben und dient z.B. der Korrektur von Basislinieneffekten (Gl. 2.3.6).

$$x_{MZ\lambda} = x - m_\lambda \quad (\text{Gl. 2.3.6})$$

Ein weiterer Schritt ist die Autoskalierung über die Proben ($AUTO_P$), die zu einem Mittelwert von Null und einer Varianz von eins führt, so dass alle Variablen einen gleichwertigen Einfluss auf die Modellierung haben. Von jedem Datenwert (x) wird zuerst der Mittelwert (m_P) abgezogen und anschließend durch die ebenfalls über die Proben gebildete Standardabweichung (s_P) dividiert (Gl. 2.3.7). Bei Spektren ist allerdings zu berücksichtigen, dass das Rauschen einer Variablen mit einer geringen Standardabweichung nach der Standardisierung zunehmen kann.

$$x_{AUTOP} = (x - m_P) / s_P \quad (\text{Gl. 2.3.7})$$

Das Prinzip der Autoskalierung kann ebenfalls auf die Variablen einer Datenmatrix ($AUTO_\lambda$) angewendet und zur Korrektur von Unterschieden in der Basislinie und von Streueffekten eingesetzt werden (auch als *standard normal variate* bezeichnet). Dabei wird jedes Spektrum zunächst mit Hilfe des über die Wellenlängen gebildeten Mittelwerts (m_λ) zentriert und im Anschluss durch die eigene Standardabweichung (s_λ) geteilt (Gl. 2.3.8).

$$x_{AUTO\lambda} = (x - m_\lambda) / s_\lambda \quad (\text{Gl. 2.3.8})$$

Datenvorverarbeitung

Genetische Algorithmen

Genetische Algorithmen (GA) sind *Black-Box*-Methoden für Such- und Optimierungsprobleme. Basierend auf dem Vorbild der natürlichen Evolution generieren sie künstliche Populationen, die einer Entwicklung mit dem einzigen Ziel der optimalen Problemlösung unterzogen werden. Dabei benötigen sie kein prob-

lemspezifisches Wissen über die von ihnen zu lösende Aufgabe, wodurch sie allerdings rein statistische Methoden werden.

Nach der Definition und Initialisierung der für den Lauf benötigten Parameter wird zunächst ein Grundbestand von Individuen kreiert, die zufällig im Suchraum positioniert werden. An jeder einzelnen Position wird der Wert der *Response*-Funktion festgestellt und an eine Wertfunktion weitergegeben, die solange maximiert wird, bis das Ziel der Suche erreicht wurde. Dabei werden die im Bezug auf die Wertfunktion „besten“ Individuen des Grundbestandes ausgewählt (*Selektion*). Durch deren Kreuzung mit anderen Individuen (*Kombination*) aus der Grundgesamtheit werden die „Schlechtesten“ durch die Nachkommen dieser Paare ersetzt. Das Ziel ist es dadurch Individuen mit besseren Eigenschaften bezüglich der Wertfunktion zu schaffen (*Crossover*), welche dann als neue Ausgangspopulation definiert werden. Als Unsicherheitsfaktoren (*Mutation*) werden dem System zusätzlich zufällige Fluktuationen hinzugefügt, die mit einer bestimmten niedrigen Wahrscheinlichkeit Sprünge zu anderen Positionen ermöglichen. Die Wiederholung dieser Schritte erfolgt bis eine gewisse Zahl an Generationen berechnet oder ein gegebenes Abbruchkriterium erfüllt wurde.

Das Ziel bei der Verwendung von genetischen Algorithmen auf spektrale Datensätze besteht darin, nur die für die Vorhersage eines bestimmten Parameters der Proben relevanten Wellenlängen herauszufiltern, um im Anschluss weniger komplexe und vorhersagekräftigere Kalibriermodelle erarbeiten zu können (LEARDI et al., 1992; LEARDI, 1994, 1996, 2000; JOUAN-RIMBAUD et al., 1995a, 1995b; LUCASIUS und KATEMAN, 1993; HIBBERT, 1993; YEE und COGHILL, 2002). Das hauptsächliche Problem bei der Verwendung von *GA* besteht in der Gefahr des *overfitting*, d. h. dass das kalkulierte Vorhersagemodell zu viele erklärende Variablen enthalten bzw. nicht gewichtete Variablen an Bedeutung gewinnen könnten. Um das zu vermeiden, wurde in den in von RICCARDO LEARDI (LEARDI und LUPIÁÑEZ, 1998; LEARDI 2000) entwickelten Algorithmus ein spezielles Testverfahren eingebaut. Die *y*-Werte werden dabei analog der Kreuzvalidierung zufällig zu den *X*-Werten angeordnet und daraus werden Vorhersagemodelle abgeleitet. Wird keine signifikante Vorhersagemöglichkeit auf vorgegebenem Niveau gefunden, kann *overfitting* ausgeschlossen werden (LEARDI und LUPIÁÑEZ, 1998; LEARDI, 2000; LEARDI et al., 2002).

Direkte orthogonale Signalkorrektur

Methoden der orthogonalen Signalkorrektur (*OSC*) werden als Filter gegen stark strukturierte Variationen in *X* eingesetzt, um hinsichtlich Streueffekten, Verschiebungen und technischen Einflüssen, aber auch probenmaterialbezogene Eigenschaften zu korrigieren. Meist baut beim Einsatz der *PLS*-Regression, die auf einer Datenmatrix mit Spektren und abhängigen Variablen basiert, die erste latente Variable auf einer hohen prozentualen Anteil der Varianz in *X* und einem geringen in *y* auf. Mit jeder weiteren *LV* deckt das Kalibriermodell einen zunehmenden prozentualen Anteil der Gesamtvarianz von *y* ab. Eine zu hohe Anzahl an latenten Variablen verringert jedoch die Robustheit des Modells und erschwert die Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Das Ziel von *OSC* ist, die Datenmatrix *X* in orthogonale Faktoren aufzuteilen. Hier-

bei werden Variationen in X , die für die Vorhersage des Parameters y nicht oder bedingt relevant sind, d.h. die orthogonal zu y verlaufen, aus der Datenmatrix X zu eliminiert. Eine im Anschluss darauf aufgebaute Kalibrierung führt demnach zu einem weniger komplexen und möglicherweise robusterem Modell. Dabei darf jedoch nicht die gesamte Orthogonalität zu y aus X entfernt werden, um *overfitting* zu vermeiden.

Viele ältere *OSC*-Verfahren vernachlässigten durch den Anspruch vollständiger Orthogonalität den Messfehler des zur Kalibrierung herangezogenen Parameters y oder integrierten *OSC*-Komponenten, die außerhalb des X -Raumes lagen, in die korrigierten Datenmatrizen (WOLD et al., 1998; SJÖBLOM et al., 1998; ANDERSSON, 1999; FEARN, 2000; YEE und COGHILL, 2002). Erst durch WESTERHUIS et al. (2001) wurden die Methoden überarbeitet und *DOSC* als korrekter Algorithmus angenommen (LUYPAERT et al., 2002). Mit Hilfe von *DOSC* werden Komponenten gefunden, die „relativ“ orthogonal zu dem Vektor y sind und die größte Varianz der X -Matrix abdecken.

In einem ersten Schritt wird hierbei die Datenmatrix $X_{n \times m}$ in zwei orthogonal zueinander stehende Gruppen aufgeteilt. Die eine beinhaltet auf den Parameter y bezogen relevante und die andere orthogonal dazu stehende Informationen. Dafür wird zunächst y auf X projiziert und in einen im X -Raum liegenden Teil und einen für X unbedeutenden Restanteil aufgeschlüsselt.

Im Anschluss wird X auf den im X -Raum liegenden Teil von y projiziert, so dass ein Restanteil ermittelt wird, der sowohl zu y als auch zu Projektion von y orthogonal ist. Auf dem nach der zweiten Projektion ermittelten Restanteil wird eine Hauptkomponentenanalyse angewendet, um die Hauptkomponente mit der höchsten Varianz zu ermitteln. Werden mehrere *DOSC*-Faktoren errechnet, werden entsprechend mehr Komponenten in diesem Prozessschritt ermittelt und in der sogenannten *Scores*-Matrix (T) zusammengefasst. Die Hauptkomponenten werden als lineare Kombinationen von X ausgedrückt. Die Matrix (T) drückt die maximale Varianz der Restanteil-Matrix und somit den für den Parameter y unwichtigen Anteil in X aus. R stellt die *Weights*-Matrix der Originalvariablen dar, welche mit Hilfe von X^+ , der Moore-Penrose-Inversen, ermittelt werden kann (Gl. 2.3.9 und 2.3.10).

$$T = XR \quad (\text{Gl. 2.3.9})$$

$$R = X^+ T \quad (\text{Gl. 2.3.10})$$

Es wird jedoch angenommen, dass der Einsatz der Moore-Penrose-Inversen zu einem *overfitting* des *DOSC*-Faktors und infolgedessen zu schlechteren Kalibriermodellen nach einer Datenvorverarbeitung mit Hilfe von *DOSC* als ohne führen kann. Indem die absolute Orthogonalität ausgeschlossen wird kann nach WESTERHUIS et al. (2001) dieser Fehler beseitigt werden. Dabei wird mit Hilfe einer Hauptkomponentenregression (*PCR*) zwischen X und der Hauptkomponente mit der höchsten Varianz eine Pseudoinverse

gebildet. Die Anzahl der Hauptkomponenten für diese *PCR* wird mit Hilfe eines zuvor bestimmten Toleranzfaktors ermittelt.

Die *Loadings*-Matrix (P) stellt zusammen mit der *Weights*-Matrix (R) oder der *Scores*-Matrix (T) den orthogonalen Anteil in der X -Matrix dar, der abgezogen werden soll (Gl. 2.3.11, 2.3.12 und 2.3.13).

$$X_{DOSC} = X - XRP' \quad (\text{Gl. 2.3.11})$$

$$X_{DOSC} = X - TP' \quad (\text{Gl. 2.3.12})$$

$$P = XT(T'T)^{-1} \quad (\text{Gl. 2.3.13})$$

3 Material und Methoden

3.1 Nachweismethoden

3.1.1 Fluoreszenzspektroskopie im *front-face*'-Modus

Mit dem Fluoreszenzspektrometer (SAFAS flx-XENIUS, SAFAS S.A., Monaco) können mit Hilfe zweier voneinander unabhängigen Gittermonochromatoren Excitations- und Emissionsspektren im *front-face*'-Modus in einem Wellenlängenbereich von 185 nm bis 1000 nm aufgenommen werden. Das Fluoreszenzsignal wird in Abständen von 0,1 nm detektiert. Die Monochromatoren sind mit konkav aufgebrachten Gittern und relativ großer Blende ausgestattet, wobei die jeweilige Bandbreite symmetrisch variabel (von 1 bis 20 nm) ist. Die Lichtquelle besteht aus einer 150 Watt Xenonlampe. Das Licht wird durch den Anregungs-Monochromator gefiltert, wodurch die Selektion einzelner Wellenlängen ermöglicht wird. Die durch einen Spalt variabler Breite geführte Strahlung trifft auf die Probe und die Fluoreszenzstrahlung wird von dort durch einen Spalt mit symmetrisch angepasster Breite am gekoppelten Emissions-Monochromator wellenlängenselektiv gefiltert. Mit Hilfe eines Photomultipliers (*PMT*) wird das Fluoreszenz-Signal detektiert und dessen Intensität ermittelt. Die Empfindlichkeit des *PMT* kann in einem Bereich von 0 Volt bis 1000 Volt eingestellt werden, wobei bei Einstellungen über 650 Volt beim verwendeten Bauteil das Rauschen der Messung zu stark ansteigt.

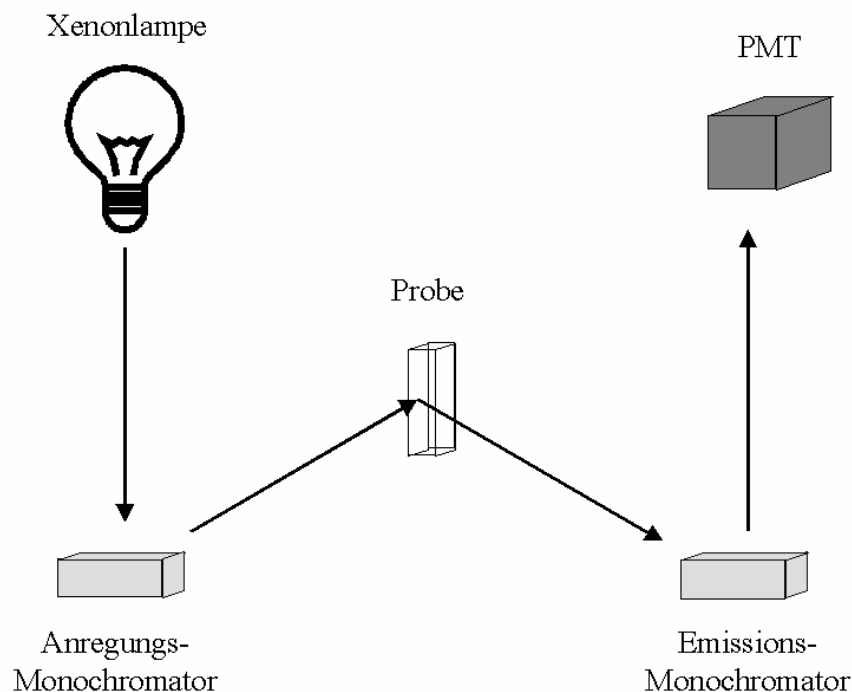


Abb. 3.1.1: Schematische Darstellung der Strahlungswege im *front-face*'-Modus.

Während sich bei der Fluoreszenzmessung von Lösungen der von unten eintretende Anregungslichtstrahl mit dem in einem 90°-Winkel frontal austretenden Emissionslichtstrahl genau in der Mitte der Küvette treffen wird im ‚*front-face*‘-Modus der Treffpunkt der beiden Strahlungswege auf die Oberfläche der zu messenden Probe projiziert (Abb. 3.1.1).

Die Messungen wurden mit an die Versuche angepassten Protokollen durchgeführt. In Tab. 3.1.1 sind die Bereiche der einzelnen möglichen Geräteparameter aufgelistet. Die Messungen von Lösungen oder Fruchtgewebe wurden in Fluoreszenzküvetten durchgeführt.

Tab. 3.1.1: Einstellungsbereiche der Parameter des Fluoreszenzspektrometers im ‚*front-face*‘-Modus für die Messung der Fluoreszenz- und Reflexionsspektren.

Anregungswellenlänge [nm]	200 - 700
Emissionswellenlänge [nm]	200 - 700
Wellenlängenbereich [nm]	200 - 700
Empfindlichkeit [V]	0 - 1000

3.1.2 Zeitaufgelöste laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie

Als Lichtquelle wird für das laser-induzierte Fluoreszenzspektrometer LF 401 Lambda (Fa. IOM GmbH, Berlin) ein gepulster Stickstofflaser mit einer Emissionswellenlänge von 337 nm, einer Pulslänge von 0,35 ns und einer Wiederholungsrate von 16 Hertz verwendet (Abb. 3.1.2). Das Gerät ist mit einer faser-optischen Sonde ausgestattet, die es ermöglicht, die Fluoreszenzspektren direkt an der Probenoberfläche zu detektieren. Die niedrige Folgefrequenz des Lasers und ein zusätzlich eingebauter elektronischer Filter, der nur impulsförmige Signale zur Weiterverarbeitung durchlässt, ermöglichen eine Fluoreszenzmessung ohne Einfluss des Umgebungslichtes. Das ermöglicht die Messung unter unterschiedlichen Lichtverhältnissen in der Praxis.

Der Laserstrahl kann optional durch eine auswechselbare Farbstoffküvette geführt werden, wodurch eine Anregung mit einer höheren Wellenlänge (im Bereich von 380 nm bis 620 nm) ermöglicht wird. Der Energieeintrag in die Proben beträgt je nach Anregungswellenlänge zwischen 1 µJ bis 5 µJ. Die Fokussierung des Lichtimpulses erfolgt durch eine Sammellinse auf die Eintrittsfläche der faseroptischen Sonde, die im ultravioletten bis nahinfraroten Spektralbereich von 250 nm bis 2000 nm tauglich ist. Sie dient zur Anregung und zur Erfassung der von der Probe emittierten Fluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit wurde meist eine Faser mit einer Länge von 3 m und einem Faserkerndurchmesser von 600 µm verwendet. Die Sonde wurde mit Hilfe eines 0,5 m langen Standard-SMA-Verbinders an das Fluoroskop gekoppelt.

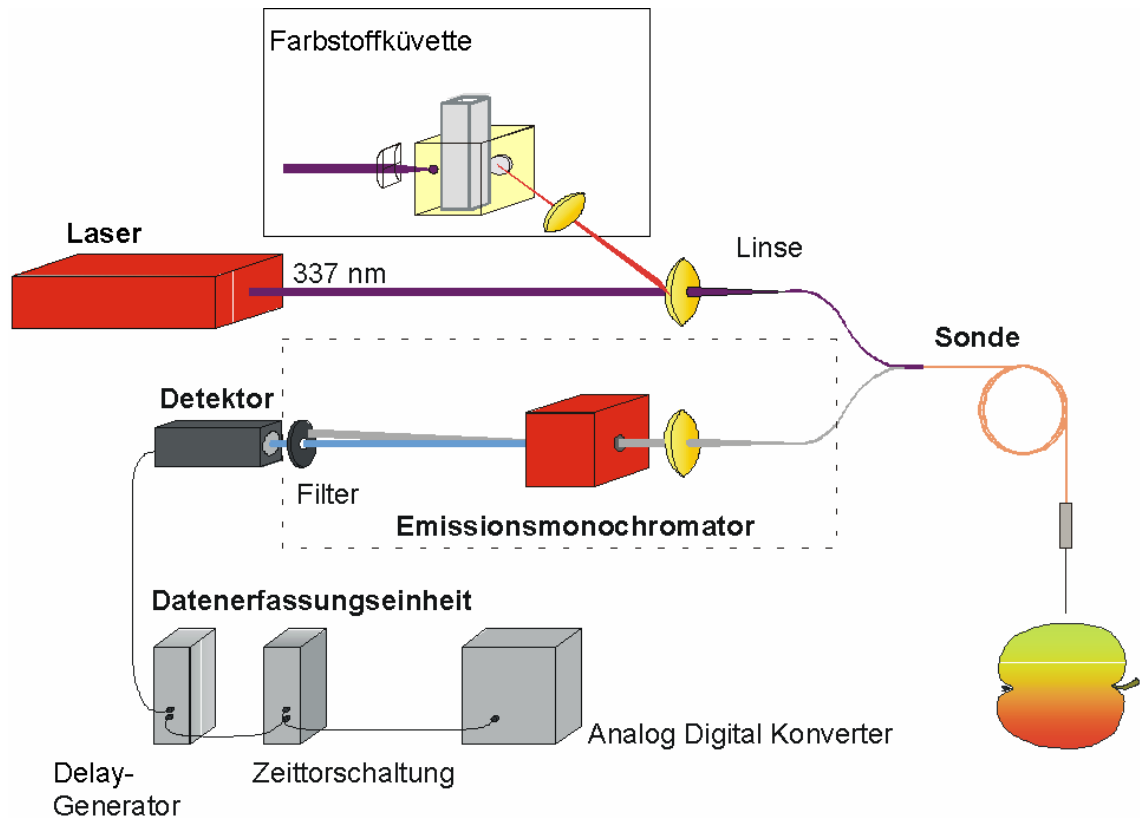


Abb. 3.1.2: Schematische Darstellung des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Das probenseitige Ende der Sonde ist in eine optisch polierte, rostfreie Edelstahlkanüle eingefasst, wodurch sie wieder verwendbar eingesetzt werden kann. Zudem wurde das an der Probe anliegende Ende der Sonde in einem Winkel von 8 Grad angeschrägt, um den möglichen Einfluss der Fresnel-Reflexion an der Faser-Proben-Grenzfläche zu minimieren. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird durch dieselbe Lichtleitfaser transportiert, bei dessen Austritt parallelisiert und durch den akusto-optisch durchstimmbaren Filter (*AOTF*) geführt, welcher als Emissionsmonochromator dient. Mit Hilfe variierender Frequenz des elektrischen Signals, welches im *AOTF*-Kristall ein Beugungsgitter bestimmter Gitterkonstante induziert und somit das Licht einer bestimmten Wellenlänge beugt, kann nach Ausblendung der ungebeugten Wellenlängen das Fluoreszenzsignal selektiv in Intervallen von bis zu 1 nm detektiert werden (in einem Bereich von 350 nm bis 820 nm). Das optische Fluoreszenzsignal wird weiter zu einem Photomultiplier geleitet, der das optische in ein messbar elektrisches Signal umwandelt. Um rückstreuendes Anregungslicht auszuschließen, ist der Photokathode ein Blockungsfilter vorgelagert. Das elektrische Signal des *PMT* wird mit einem getorten Integrator gemessen. Die Halbwertsbreite des Integratortores, welches nach erfolgter Triggerung in der Schaltung erzeugt wird, beträgt 2 ns. Innerhalb dieser Zeit wird das gerade am Messeingang anliegende Signal integriert. Die zeitliche Lage dieses Tores kann mit einer Genauigkeit von 0,1 ns eingestellt werden und ermöglicht somit eine zeitaufgelöste Darstellung des Fluoreszenzsignals. Da die Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichem Probenmaterial stark variieren kann, ist es möglich die Empfindlichkeit des *PMT* entsprechend auf niedrig (600 Volt), mittel (800 Volt) oder hoch (1000 Volt) einzustellen. Im Mikrocontroller werden im Anschluss mit Hilfe eines 8-Bit-Analog-

Digital-Umwandlers (*ADU*) die integrierten Einzelsignale digitalisiert und der festgelegte Mittelwert gebildet.

Die Einstellung der zeitlichen Lage des Integrators erfolgt durch den Mikrocontroller. Durch schrittweise Verschiebung der Torlage kann die zeitliche Charakteristik eines Fluoreszenzsignals abgetastet und Fluoreszenzabklingkurven gemessen werden. Durch die Analyse der Form der Abklingkurven können Fluoreszenzlebensdauern ermittelt werden. Darüber hinaus können $\lambda\tau$ -Kurven gemessen werden, die das Probenmaterial anhand von aufeinander folgenden Spektren im ausgewählten Wellenlängenbereich zu verschiedenen Zeiteinstellungen darstellen.

Die Einstellungen der Zeitspanne und der Wellenlänge bei der die Abklingkurve aufgenommen werden soll, des zu messenden Wellenlängenbereiches und der zeitlichen Lage des Zeittors für spektrale Messungen, sowie der *PMT*-Empfindlichkeit und der Höhe der Einzelsignale zur Mittelwertbildung können festgelegt werden. Das Fluoreszenzsignal wird in Prozent angegeben, wobei 100 % der Vollaussteuerung der Integratorschaltung entsprechen, die auf ca. 1 Volt Signalamplitude an 50 Ohm eingestellt ist. Um der Laserenergieschwankung entgegen zu wirken, die sowohl innerhalb einer Messung während der Abtastung der einzelnen Wellenlängen als auch im Verlauf langfristiger Versuchsreihen auftreten kann, wurden die Daten entsprechend auf 100 % Laserintensität umgerechnet.

Die Messungen wurden mit jeweils angepassten Protokollen durchgeführt, wobei die in Tab. 3.1.2 angegebenen Bereiche der einzelnen Parameter möglich waren. Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurden $\lambda\tau$ -Kurven aufgezeichnet, um die entsprechenden Gerätegrößen zu ermitteln. Die Messungen an Lösungen erfolgten in Aluminium-Küvetten, die an intakten bzw. geschnittenen Produkten auf einem Positioniertisch mit der Möglichkeit x, y, und z-Richtung zu positionieren.

Tab. 3.1.2: Einstellungsbereiche der Parameter des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337, 365, 488, 590
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 820
Zeittor [ns]	0 - 25
Mittelwertbildung	über 1 – 64 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	600, 800, 1000

3.1.3 Chromatographische Bestimmungsmethoden

Apfel

Der Polyphenolgehalt von Äpfeln wurde mit Hilfe einer Umkehrphasen (*reversed phase*) Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*HPLC*) ermittelt. Bei diesem Trennverfahren wird die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert. Kleine Fruchtfleisch- und Apfelschalstückchen, an denen zunächst die Fluoreszenzspektren aufgezeichnet wurden, wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert. Während der gesamten Extraktionsprozedur wurden die Proben unter ständiger Kühlung gehalten. Von dem homogenisierten Fruchtgewebe wurden 50 mg in Eppendorf-Tuben gegeben und mit 50 µL eines Puffers (98 mL Methanol + 2 mL Ameisensäure) aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für je 15 Minuten inkubiert und bei 4°C zentrifugiert, danach in Glasküvetten transferiert und bis zur Analyse bei –20°C gelagert.

Die *HPLC*-Analyse wurde mit Hilfe eines HP 1100 Systems (Hewlett Packard, Agilent Technologies, Palo Alto, USA), in einer „Prevail Organic Acid“-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikel-Durchmesser) (Alltech Associates, Deerfield, IL, USA) mit einer Vorsäule desselben Materials durchgeführt (stationäre Phase). Als Eluent (mobile Phase) wurde Wasser, welches auf einen *pH*-Wert von 2,55 mit Ameisensäure eingestellt wurde (Puffer A) und Methanol (Puffer B) verwendet und nach vorheriger Filterung und Entgasung durch die Säule mit einer konstanten Flussrate von 1 mL/min geleitet. Die Gradientenelution wurde wie folgt eingestellt: 0 % B zu 30 % B in 30 min., 30 % B zu 100 % B in 20 min., 100 % B für 10 min. und 100 % B zu 0 % B in 10 min. Die Phenolischen Substanzen wurden mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors bei 280 nm, 325 nm, 360 nm und 520 nm detektiert.

Die Identifikation der Substanzen erfolgte mit Hilfe der Retentionszeiten und den *UV*-Spektren der Standards. Chlorogensäure wurde von Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium) bezogen, Kaffeesäure von Acros Organics (Geel, Belgium).

Erdbeere

Für die Bestimmung der Polyphenolgehalte von Erdbeeren wurden die Früchte in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend für 48 Stunden gefriergetrocknet (BETA 1-8 LMC-1, Christ Gefrier Trocknungsanlagen, Osterode) und bis zur Phenolextraktion im Exikator bzw. in luftdichten Kunststoffbeuteln aus Polyethylen gelagert. An den markierten Messpunkten, an denen zuvor die Fluoreszenzspektren aufgezeichnet wurden, wurde die Erdbeerepidermis entnommen und die Nüsschen entfernt. 2 mg des mit Zusatz von Quarzsand gemörserten Fruchtgewebes wurden in Eppendorf-Tuben mit 50 µL eines 0,5 mg / mL konzentrierten Flavonstandards und Methanol auf 1,6 bis 1,8 mL aufgefüllt. Nach 30 min. gekühlter Ultraschall-Behandlung wurden die Proben 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, im

Univapo zur Trocknung eingeengt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Zur Einspritzung in die *HPLC* wurde in entsprechender Menge ($\text{mg} \cdot 30$) Methanol aufgenommen.

Die *HPLC*-Analyse wurde mit Hilfe eines Gilson-Abimed Systems (Modell 231, GynkoteK *HPLC*, Germering) mit zwei Pumpen (Modell 422, Kontron Instruments, Neufahrn) und einem Dioden-Array-Detektor (Bio Tek Kontron 540, Kontron Instruments, Neufahrn) durchgeführt. Für die Nachsäulen-Derivatisierung wurde eine weitere *HPLC*-Pumpe (Modell 300 C, GynkoteK *HPLC*, Germering) und ein *VIS*-Detektor (640nm, Kontron Detektor 432, Kontron Instruments, Neufahrn) eingesetzt. Zur Trennung wurde eine „Nucleosil 120-3 C18“-Säule (250 x 4 mm, 3 μm Partikel-Durchmesser, Machery-Nagel *HPLC*, Düren) verwendet. Als Eluent wurde fünfprozentige Ameisensäure (Puffer A) und Methanol (Puffer B) verwendet und durch die Säule mit einer konstanten Flussrate von 0,5 mL/min geleitet. Die Gradientenelution wurde wie folgt eingestellt: 0 bis 5 min., isokratisch, 5 % B in A; 5 bis 10 min., 5 bis 10 % B in A; 10 bis 15 min., isokratisch, 10 % B in A; 15 bis 35 min., 10 bis 15 % B in A; 35 bis 55 min., isokratisch, 15 % B in A; 55 bis 70 min., 15 bis 20 % B in A; 70 bis 80 min., isokratisch, 20 % B in A; 80 bis 95 min., 20 bis 25 % B in A; 95 bis 125 min., 25 bis 30 % B in A; 125 bis 145 min., 30 bis 40 % B in A; 145 bis 160 min., 40 bis 50 % B in A; 160 bis 175 min., 50 bis 90 % B in A; 175 bis 195 min., isokratisch, 90 % B in A; 195 bis 210 min., 90 bis 5 % B in A; 210 bis 235 min., isokratisch, 5 % B in A (TREUTTER et al., 1994). Die phenolischen Substanzen wurden mit 280 nm detektiert, die Flavan-3-ole zusätzlich bei 640 nm mittels einer Nachsäulen-Derivatisierung mit p-Dimethyl-Aminocinnamic Aldehyde (*DMACA*) ermittelt (TREUTTER, 1989). Als interner Standard wurde Flavon verwendet. Die Identifikation der Substanzen erfolgte anhand von Abgleichungen der Retentionszeiten und der *UV*-Spektren mit Standards und anschließenden Co-Chromatographien. Die von SUSANNE RÖMMELT (2002) identifizierte und aufgereinigte Fraktion der p-Cumaroyl-Glucose wurde als Vergleichsstandard verwendet.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Vorversuche

Abstandsmessung

Am Apfel (*Malus xdomestica* Borkh.) der Sorte 'Elstar' (aus dem Einzelhandel) wurde mit dem laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer der Einfluss der Entfernung der Sonde zur Probenoberfläche ermittelt. Mit einer Wiederholungsrate von drei wurden die Fluoreszenzspektren mit einem Abstand von 0 mm bis 3 mm in 1mm-Schritten zwischen der Sonde und der Fruchtschale entsprechend der in Tab. 3.2.1 aufgeführten Geräteeinstellungen detektiert. Die Spektren wurden mittels gleitenden Mittelwert (sieben Stützstellen) geglättet.

Tab. 3.2.1: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 820, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	8,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	800

Temperatur

Die drei aus dem Einzelhandel erworbenen Äpfel (*Malus domestica* Borkh.) wurden jeweils an zwei unterschiedlichen Stellen an der Fruchtschale gemessen nachdem sie zuvor im Kühlschrank auf 11°C gekühlt und anschließend auf Raumtemperatur (22°C) und mit Hilfe eines Trockenschrankes auf etwa 28°C erwärmt wurden. Die Temperierung dauerte mindestens zwei Stunden. Die Temperaturen des Fruchtfleisches wurden während der Messung an den einzelnen Proben mit Hilfe eines Oberflächenthermometers überprüft. Die Spektren wurden mit dem laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer und den entsprechenden Einstellungen (Tab. 3.2.2) direkt an der Probe aufgezeichnet. Im Anschluss wurde der Mittelwert der Spektren über drei Äpfel mit jeweils zwei unterschiedlichen Messpunkten und drei Wiederholungen je Temperaturstufe errechnet und mit Hilfe eines gleitenden Mittelwertes (sieben Stützstellen) geglättet.

Tab. 3.2.2: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 800, in 1nm-Schritten
Zeittor [ns]	6,5
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	1000

pH-Wert

Jeweils 25 mg Chlorogensäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Kaffeesäure und Ferulasäure (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) wurden in 25 mL Methanol (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) gelöst und anschließend 1 zu 10 mit Methanol verdünnt. Die Fluoreszenzspektren wurden jeweils an den 0,1 mg / mL konzentrierten Lösungen ohne und mit Zusatz von wahlweise 0,1 mL 0,1 molarer Salzsäure bzw. 0,1 mL 0,1 molarer Natronlauge (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) aufgezeichnet. Die pH-Wert-Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines pH-Wert-Messgerätes (InoLab, Gerber Instruments, Effretikon,

Schweiz). Die Lösungen wurden je dreimal mit dem laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer und den in Tab. 3.2.3 aufgeführten Geräteeinstellungen gemessen. Die Glättung der gemittelten Spektren erfolgte mit Hilfe eines gleitenden Mittelwertes über sieben Stützstellen.

Tab. 3.2.3: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 600, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	8,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	800

Bleachingeffekt

Als Fruchtmaterial wurden drei Äpfel (*Malus xdomestica* Borkh.) der Sorte 'Elstar', ohne erkennbare Mängel, aus dem Einzelhandel ausgesucht und visuell jeweils ein Messpunkt auf der roten und der grünen Fruchtschale ausgewählt. Die Äpfel wurden bei Raumtemperatur in eine feste Position gebracht und die Sonde des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers direkt aufgelegt. Mit den entsprechenden Geräteeinstellungen (Tab. 3.2.4) wurden ohne Pause zwischen den Einzelmessungen 40 Spektren je Messpunkt an jedem Apfel aufgezeichnet. Die Spektren wurden durch Mittelwertbildung über die drei Äpfel getrennt für die rote und die grüne Seite ermittelt und mit Hilfe eines gleitenden Mittelwerts (sieben Stützstellen) geglättet.

Tab. 3.2.4: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 820, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	8,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	800

3.2.2 Varianzanalyse der Fluoreszenz von Gartenbauprodukten

Lagerversuch von Äpfeln

Als Probenmaterial für die Lagerversuche in den Jahren 2002 und 2003 wurden Äpfel (*Malus xdomestica* Borkh.) der Sorte 'Elstar' am Standort Bavendorf in der oberschwäbischen Jungmoränen-Landschaft ausgewählt. Der Versuchsbetrieb befindet sich an einem leicht gegen Osten geneigten Hang in 470 m bis 500

m Höhe über NN und ist in Deutschland mit seiner durchschnittlichen Jahresmitteltemperatur von 8,1° C den später reifenden Anbaugebieten zuzuordnen. Bei dem Boden handelt es sich um eine Pseudogley-Parabraunerde mit einer Bodenzahl zwischen 55 und 60 Punkten. Die Düngung ist entsprechend den anzustrebenden Bodenwerten von pH 6,0 - 6,5, Phosphor 10 mg bis 20 mg, Kalium 20 mg bis 30 mg, Magnesium 7 mg bis 15 mg je 100 g Boden ausgerichtet.

Tab. 3.2.5: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337	488
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 800, in 2nm-Schritten	350 – 800, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	6,5	4,5
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	1000	1000

Im September 2002 wurden die Äpfel ($n = 50$) der Sorte 'Elstar' am Standort Bavendorf geerntet. Die zweimonatige Lagerung erfolgte in einem Lager mit kontrollierter Atmosphäre (CA) bei 4°C, 1,8% O_2 und 2,5% CO_2 . An jedem Apfel wurde ein Messpunkt in der Mitte der auf der Fruchtschale zwischen Blüte und Stielansatz entlang der größten Breite der Frucht (äquatorial) bestimmt, entsprechend markiert und mit dem laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer und den in Tab. 3.2.5 aufgeführten Geräteeinstellungen vor und nach der Lagerung gemessen.

Tab. 3.2.6: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 700, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	8,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	600

Im September 2003 wurden die Äpfel ($n = 100$) der Sorte 'Elstar' am Standort Bavendorf geerntet und für zwei bzw. vier Monate in einem Kühllager bei 4°C eingelagert. Die Messungen mit dem laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer erfolgte (Tab. 3.2.6) vor und nach der zwei- bzw. viermonatigen Lagerung. Im Gegensatz zum Lagerversuch im Vorjahr wurde auf die Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen verzichtet. An jedem Apfel wurde ein äquatorialer Messpunkt auf der grünen und einer auf der roten Seite der Frucht ausgewählt und entsprechend markiert.

Lagerversuch von Möhren

Für den Lagerversuch von Möhren (*Daucus carota ssp. sativus*) im Jahr 2003 wurde die Sorte 'Bolero' am Standort Geisenheim mit einer Bestandsdichte von 133 Pflanzen / m² ausgewählt. Die Lufttemperaturen von Juni 2003 bis Juli 2003 betrugen im Durchschnitt dieser Monate 17,8 °C, die des Bodens 20,12 °C. Die Düngung mit Stickstoff, Kali und Phosphat wurde entsprechend den Bodenanalysen nach dem Bedarf der Kultur ausgerichtet.

Im Oktober 2003 wurden die Möhren geerntet und in drei Gruppen aufgeteilt ($n = 27$) bei 0°C in einem Kühlbrutschrank, bei 4°C im Kühllager bzw. bei Raumtemperatur (20°C +/- 2°C) eingelagert. Die Messung der Fluoreszenzspektren erfolgte mit dem laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer vor und nach vierwöchiger Lagerung (Tab. 3.2.7). Der Messpunkt wurde in der Mitte der Proben auf der Möhrenscheibe ausgewählt und entsprechend markiert.

Tab. 3.2.7: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 600, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	8,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	800

3.2.3 Reabsorptions- und Löschungseffekte

Die in diesem Abschnitt folgenden Versuche wurden am Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA PG, Frankreich) durchgeführt. Die Phenolstandards Catechin, Chlorogensäure, Epicatechin, Kaffeesäure, Rutin (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l., Lyon, Frankreich) und Phlorizin (Extrasynthese S.A., Genay, Frankreich) und die Fruchtextrakte wurden in Methanol gelöst und mit dem Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus gemessen.

Konzentrationslöschung

Zur Messung der Fluoreszenzintensität von Phenolen unterschiedlicher Konzentration, wurden jeweils drei Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL von Kaffeesäure, Chlorogensäure, Catechin und Epicatechin in Methanol angesetzt und auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL und 0,01 mg/mL verdünnt. Die Emissionsspektren wurden mit den in der Tab. 3.2.8 aufgeführten Geräteeinstellungen gemessen und über die jeweils drei Messungen je Standard gemittelt.

Tab. 3.2.8: Einstellungen für die Detektion der Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im *front-face*-Modus.

	Kaffeesäure	Chlorogensäure	Catechin	Epicatechin
Anregungswellenlänge [nm]	364	364	280	290
Wellenlängenbereich [nm]	400-700	400-700	300-700	300-700
Empfindlichkeit [V]	500	500	400	400

Interaktion Reinstsubstanzen

Tab. 3.2.9: Mischungen mit jeweils 1 mL der Phenolstandardlösungen aufgefüllt auf 10 mL mit Methanol. Die mit x gekennzeichneten Zusammensetzungen wurden hergestellt (Cat: Catechin, Chl: Chlorogensäure, Kaf: Kaffeesäure).

	Cat. 0,5 mg/mL	Cat. 0,25 mg/mL	Cat. 0,1 mg/mL	Chl. 0,5 mg/mL	Chl. 0,25 mg/mL	Chl. 0,1 mg/mL
Kaf. 0,5 mg/mL	x	x	x	x	x	x
Kaf. 0,25 mg/mL	x		x	x		x
Kaf. 0,1 mg/mL	x	x		x	x	
Chl. 0,5 mg/mL	x	x	x			
Chl. 0,25 mg/mL	x		x			
Chl. 0,1 mg/mL	x	x				

Um den Einfluss der in Methanol gelösten Phenolstandards aufeinander zu messen, wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Catechin, Kaffeesäure und Chlorogensäure (Hydroxyzimtsäuren) hergestellt. Die Ausgangskonzentrationen betrugen dabei 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL und 0,1 mg/mL, die unterschiedliche Zusammenstellung der 21 Lösungen ist in Tab. 3.2.9 dargestellt. In den Mischlösungen wurde je 1 mL der zwei Phenolstandardlösungen auf insgesamt 10 mL mit Methanol aufgefüllt. Alle 21 Lösungen wurden dreimal hergestellt und mit dem Fluoreszenzspektrometer im *front-face*-Modus (Tab.

3.2.10) gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert über die drei Wiederholungen gebildet. Dieselben Versuchsreihen wurden anstelle von Catechin auch mit Epicatechin durchgeführt.

Tab. 3.2.10: Einstellungen für die Detektion der Anregungs- und Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im *front-face*-Modus.

Wellenlängen [nm]	Anregung	310, 436, 440
	Emission	288, 364
Wellenlängenbereich [nm]	Anregung	200-400
	Emission	300-700
Empfindlichkeit [V]		500

Im Anschluss wurden jeweils drei Lösungen von 0,5 mg/mL Phloridzin und Rutin in Methanol hergestellt. Je ein Milliliter dieser Lösungen wurde einem Milliliter einer 0,5 mg/mL konzentrierten Catechin-, Epicatechin-, Kaffeesäure- bzw. Chlorogensäurelösung zugegeben und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt (Tab. 3.2.11). Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden im *front-face*-Modus mit einer Wiederholungsrate von drei und den in Tab. 3.2.12 aufgeführten Einstellungen gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert über die drei Spektren gebildet.

Tab. 3.2.11: Mischungen mit jeweils 1 mL der Phenolstandardlösungen aufgefüllt auf 10 mL mit Methanol.

	Phloridzin (0,5 mg/mL)	Rutin (0,5 mg/mL)
Kaffeesäure (0,5 mg/mL)	X	X
Chlorogensäure (0,5 mg/mL)	X	X
Catechin (0,5 mg/mL)	X	X
Epicatechin (0,5 mg/mL)	X	X

Tab. 3.2.12: Einstellungen für die Detektion der Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.

	Catechine + Phloridzin bzw. Rutin	Hydroxyzimtsäuren + Phloridzin bzw. Rutin
Wellenlängen [nm]	280	364
Wellenlängenbereich [nm]	300-700	400-700
Empfindlichkeit [V]	500	400

Reinstsubstanzen in Apfelextrakten

Für die Phenolextraktion wurden Äpfel ($n = 30$) der Sorte 'Golden Delicious' ohne äußere mechanische und mikrobielle Qualitätsmängel im Einzelhandel ausgewählt. Die Äpfel wurden entlang der Fruchtachse geviertelt und aus einem Viertel eine Scheibe (5 g) geschnitten. Die Fruchtstücke wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert, davon 0,5 g in einem 10 mL-Messröhrchen abgewogen und mit 10 mL Methanol aufgefüllt. Den zentrifugierten Extrakten wurden 5 mL der Lösung entnommen und je 1 mL in 5 mL-Messröhrchen gegeben. Als Referenz wurde eine Probe mit 1 mL Extrakt und 4 mL Methanol ohne Zusätze gemessen. Den anderen Messbehältern wurden 1 mL Chlorogensäure, Kaffeesäure, Phloridzin oder Rutin in einer Konzentration von 0,25 mg/mL zugeführt und mit 3 mL Methanol aufgefüllt. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus aufgezeichnet (Tab. 3.2.13).

Tab. 3.2.13: Einstellungen für die Detektion der Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im ‚front-face‘-Modus.

Anregungswellenlänge [nm]	288, 364
Wellenlängenbereich [nm]	300 - 700
Empfindlichkeit [V]	600

Analyse am Produkt: Verbräunungsreaktionen

Im Einzelhandel wurden Äpfel ($n = 6$) der Sorte 'Golden Delicious' ohne sichtbare äußere Beschädigungen und mikrobielle Mängel ausgewählt. Die Früchte wurden entlang der Fruchtachse geteilt. Aus jeder Hälfte wurde auf Höhe des Äquators eine Scheibe geschnitten und mittig entsprechend der Größe der Küvette angepasst. Das Fruchtgewebe wurde an der Küvettenwand anliegend in die Küvette eingeführt. Die Anregungs-, Emissions- und Reflexionsspektren wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten im dreiminütigen Zyklus im ‚front-face‘-Modus mit dem Fluoreszenzspektrometer und den in Tab. 3.2.14 aufgeführten Einstellungen gemessen.

Tab. 3.2.14: Einstellungen für die Detektion der Anregungs- und Emissionsspektren gemessen am Fluoreszenzspektrometer im *front-face* '-Modus.

	Emission	Reflexion
Anregungswellenlänge [nm]	360	-
Wellenlängenbereich [nm]	400-700	200-700
Empfindlichkeit [V]	500	150

Für die Datenauswertung wurden die Intensität (I) der Anregungs- und Emissionsspektren mit Hilfe der Reflexionsspektren pro Wellenlänge (λ) korrigiert:

$$I_{\text{korrigiert}}(\lambda) = I_{\text{Emission}}(\lambda) / I_{\text{Reflexion}}(\lambda)$$

3.2.4 Versuchsreihen zur Kalibrierung und Validierung

Apfel

CA-gelagerte (1,5% O_2 , 2,5% CO_2 , 4°C) Äpfel ($n = 300$) der Sorte 'Jonagold' wurden in einer belgischen Veiling gekauft und im Verlauf einer Woche, in der sie an der Katholieke Universiteit Leuven (*KUL*) in Belgien parallel zu den eigenen Versuchen mehreren Tests unterzogen wurden, in einem Kühllager (2 °C bis 4°C) zwischengelagert.

Tab. 3.2.15: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 700, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	8,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	800

Aus diesem Pool wurden über fünf Tage verteilt Früchte ($n = 50$) zufällig ausgewählt und am laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer äquatorial an der roten und der grünen Fruchtschale gemessen (Tab. 3.2.15). Der Polyphenolgehalt der Äpfel wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*HPLC*) ermittelt (siehe 3.1.3).

Erdbeere

Erdbeeren der Sorte 'Elsanta' wurden im Abstand von einer Woche im November 2005 aus einem institutsnahen Betrieb in Brandenburg geerntet. Die Früchte wurden im hydroponischen Verfahren unter Glas angebaut. Es wurden je Erntetermin drei Reifestufen ausgewählt und die Früchte in weißlich-grüne (Reifestufe 1), hellrote mit weißer Spitze (Reifestufe 2) und dunkelrote (Reifestufe 3) Erdbeeren eingeteilt. Die Proben wurden am laser-induzierten Fluoreszenzspektrometer gemessen (Tab. 3.2.16) und parallel dazu mit Hilfe einer Spektrometereinheit (MMS1 *Near-enhanced*, Zeiss-Jena; vgl. ZUDE, 2003) Reflexionsspektren aufgezeichnet. Der Messpunkt wurde äquatorial an der Fruchtschale ausgewählt und entsprechend markiert. Die Ermittlung des Polyphenolgehalts der Erdbeeren erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die zum ersten Termin geernteten Früchten ($n = 32$) wurden für die Erarbeitung von Kalibriermodellen den zerstörungsfreien und chromatographischen Messverfahren unterzogen. Die zum zweiten Erntezeitpunkt entnommenen Erdbeeren ($n = 35$) wurden für die Validierung der zuvor erarbeiteten Modelle ausgewertet.

Tab. 3.2.16: Einstellungen des laser-induzierten Fluoreszenzspektrometers.

Anregungswellenlänge [nm]	337
Wellenlängenbereich [nm]	350 – 820, in 2nm-Schritten
Zeittor [ns]	5,0
Mittelwertbildung	über 4 Messwerte
Empfindlichkeit [V]	800

3.3 Datenauswertung

Für die Lagerversuche von Äpfeln und Möhren wurden die Fluoreszenzspektren der Proben den Signalvorverarbeitungsmethoden der Glättung, Derivativbildung und Normierung mit Hilfe der PLS_Toolbox 3.0 (Eigenvector Research, USA) in MATLAB 7.0 (The Math Works, USA) unterzogen. Anschließend wurden die vorverarbeiteten Daten mittels Hauptkomponentenanalyse mit den erwähnten Programmen ausgewertet.

Für die Versuchsreihen der Kalibrierung und Validierung wurden die Fluoreszenzspektren, die Reflexionsspektren und die chromatographisch bestimmten Polyphenolgehalte der Äpfel und Erdbeeren ebenfalls den oben genannten Signalvorverarbeitungsmethoden mit Hilfe der PLS_Toolbox 3.0 in MATLAB 7.0 unterzogen. Die Reflexionsspektren wurden mit Hilfe eines kubischen Interpolationsverfahrens (*spline*) in MATLAB 7.0 auf die gleichen Wellenlängenabstände (2 nm) wie in den Fluoreszenzspektren umgerechnet (BIRAN und BREINER, 1999). Als Datenvorverarbeitungsmethoden wurden die in MATLAB erarbeiteten Programme für genetische Algorithmen (*GA*) von LEARDI (LEARDI und LUPIÁÑEZ, 1998; LEARDI, 2000) und für die direkte orthogonale Signalkorrektur (*DOSC*) von WESTERHUIS et al. (2001) (©

2005 Biosystems Data Analysis Group, Universiteit van Amsterdam, Holland) eingesetzt. Die Methode der genetischen Algorithmen wurde jeweils mit 200 Durchläufen und einem Fehler von 0,001 als Abbruchkriterium der Regressionsanalyse durchgeführt. Bei der direkten orthogonalen Signalkorrektur nach WESTERHUIS et al. wird nicht die gesamte Orthogonalität zu y aus X entfernt, um schlechtere Kalibriermodelle zu vermeiden. Die Berechnung der *DOSC*-Faktoren erfolgte daher mit einer festgelegten Toleranz von 0.001 und wurde basierend auf den Untersuchungsergebnissen der Arbeitsgruppe mit maximal zwei *DOSC*-Faktoren angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Gerätebedingte Einflussfaktoren

Standards

In längeren Versuchsreihen sind gerätetechnisch bedingte systematische Fehler vor allem durch Veränderungen in der Laserenergie sowie am Sensor bezüglich der Reaktion und Wellenlängengenauigkeit aufgetreten. Verschiedene Standards wurden zur Korrektur getestet. Als Festkörperreferenzobjekte wurden ein Spektralons (100% weiß, Labsphere, USA) und ein Rubin-Kristall (Fa. IOM GmbH, Berlin) ausgewählt (Abb. 4.1.1). Die beiden gering fluoreszierenden Kalibrierstandards weisen bei wiederholter Messung ($n = 15$) eine hohe Standardabweichung auf, da die unebenen Oberflächen der festen Körper zu störenden Streueffekten führen.

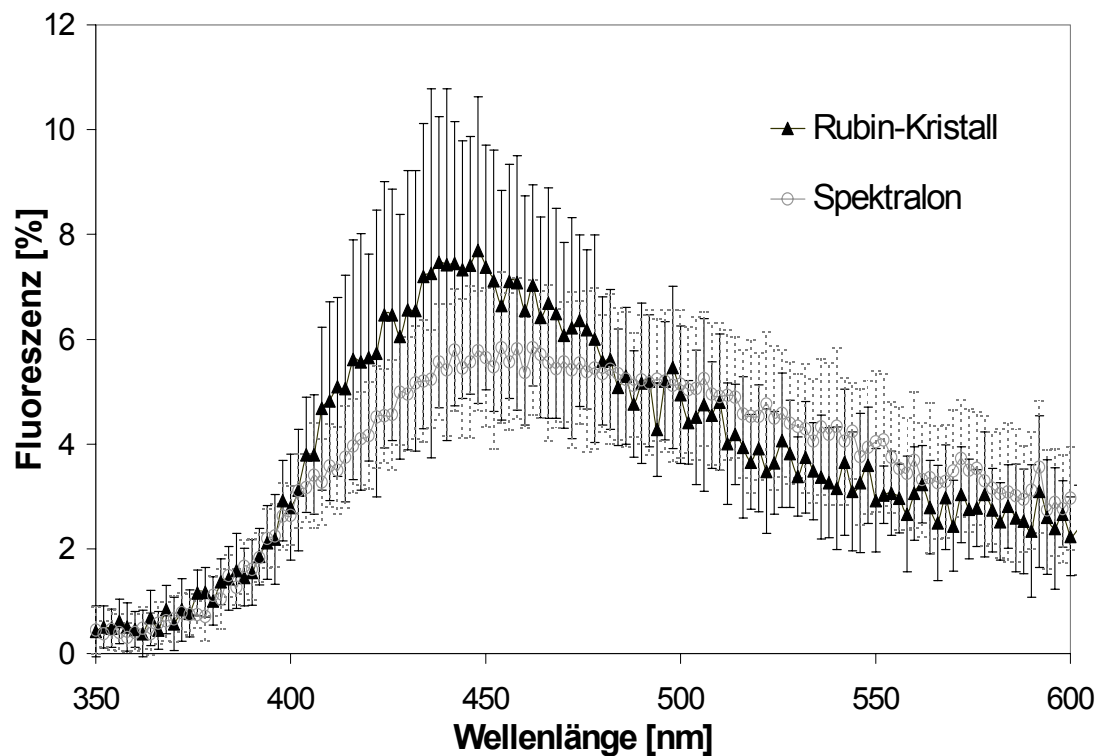


Abb. 4.1.1: Mittelwert und Standardabweichung ($n = 15$) der Fluoreszenzspektren eines Rubin-Kristalls und des Spektralons. Die Standards wurden mit unterschiedlicher Empfindlichkeit des Detektors gemessen.

Ergänzend wurde das laser-induzierte Fluoreszenzsignal an einem flüssigen Standard einer fluoreszierenden Lösung getestet. Die mehrfachen Labormessungen ($n = 15$) an in destilliertem Wasser gelösten Riboflavin weisen wiederum eine hohe Standardabweichung in der Fluoreszenzintensität auf (Abb. 4.1.2). Eine Korrektur hinsichtlich vertikaler Veränderungen war auch mit Hilfe dieses Kalibrierstandards nicht

möglich, da bei der Herstellung der Standardlösung kleinste Konzentrationsunterschiede nicht ausgeschlossen werden können, die zu einer erheblichen Variation im Fluoreszenzsignal führen. Die konstante maximalen Fluoreszenzintensität ($\lambda = 542 \text{ nm}$) wurde jedoch in den folgenden Versuchsreihen wiederholt überprüft, um eine Wellenlängenverschiebung während der Messungen auszuschließen.

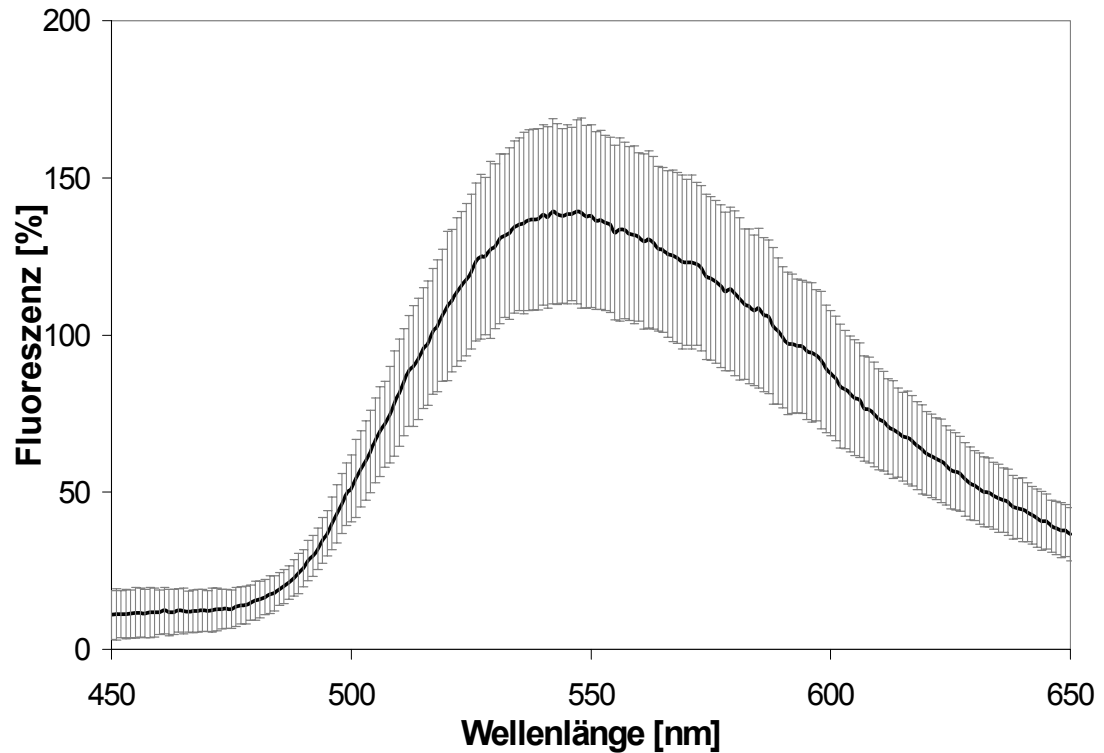


Abb. 4.1.2: Mittelwert und Standardabweichung der Fluoreszenzspektren ($n = 15$) gemessen an in destilliertem Wasser gelösten Riboflavin.

Aufgrund des Mangels an einfach zu handhabenden Standards wurden in der vorliegenden Arbeit mathematische Datenvorverarbeitungsmethoden für die Korrektur technischbedingter Nulllinienverschiebung und Veränderungen der gemessenen Intensitäten eingesetzt.

Anregungsenergie

Der im Versuch verwendete Stickstofflaser ermöglicht eine hohe Energie zur Anregung der in den Proben enthaltenen Fluorophore, weist jedoch eine Variation im Mittel von 0,07 % zwischen den Einzelmessungen auf, die jedoch auf > 50 % bei wiederholten Messungen über einen längeren Zeitraum ansteigen kann. Diese Abweichungen sind auch zwischen den Impulsen zur Anregung an den einzelnen Wellenlängen während der Aufzeichnung eines Spektrums sichtbar (Abb. 4.1.3). Da die Intensität der gemessenen Fluoreszenzspektren entlang der Wellenlängen abhängig von der Anregungsintensität ist, wurde die Leistung des Lasers parallel aufgezeichnet. Die effektive Laserenergie wurde zur Korrektur der einzelnen

Fluoreszenzspektren verwendet, um die Einzelproben entlang einer Versuchsreihe vergleichbar zu machen (Abb. 4.1.3). Die Daten wurden hierzu entsprechend auf 100% Laserintensität umgerechnet.

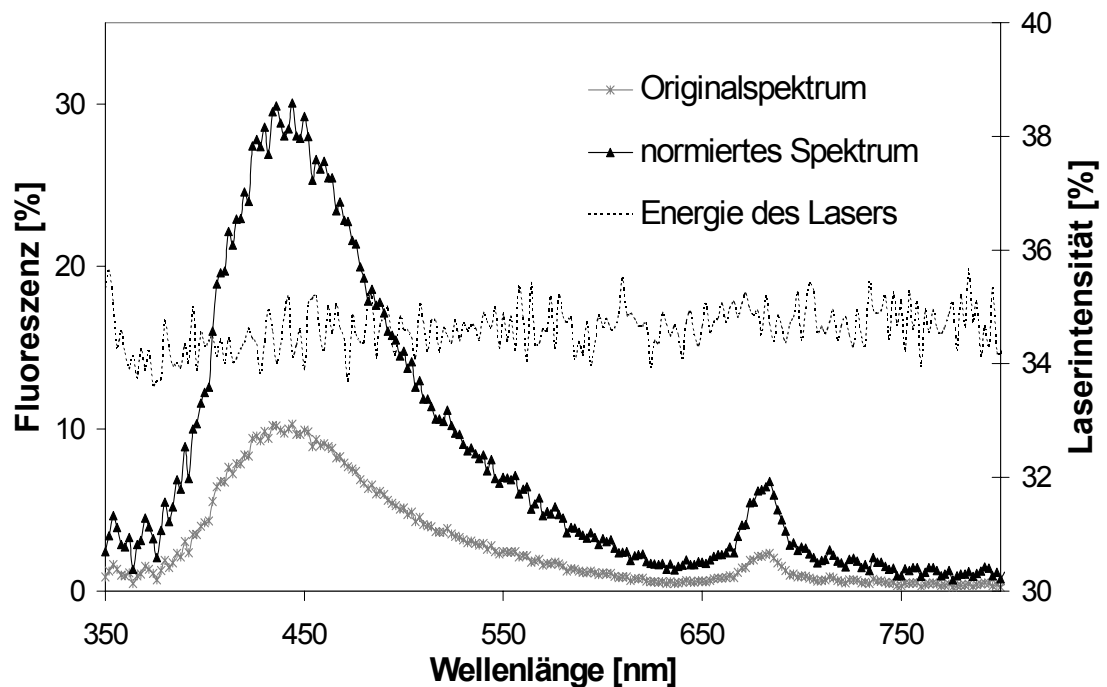


Abb. 4.1.3: Korrektur des Fluoreszenzspektrums mit Hilfe der Laserenergievariation am Beispiel der Erdbeere.

Abstandsmessung

Der Messaufbau zur laser-induzierten Fluoreszenzanalyse ermöglicht durch die Verwendung von Glasfasern grundsätzlich auch eine Remote-Messung. Mit dem Ziel, den geeigneten Messaufbau für die Labor-messungen an ganzen Früchten zu bestimmen, wurde in Vorversuchen an verschiedenen Früchten die Sonde direkt auf der Fruchtoberfläche sowie in drei Abständen von 1 bis 3 mm von der Probenoberfläche fixiert und Messungen durchgeführt. Vergleicht man die gemessene Fluoreszenz beispielhaft bei 420 nm für den blauen und 680 nm für den roten Wellenlängenbereich am Apfel, ist die Intensität direkt an der Frucht jeweils viermal höher als bei einem Abstand von 3 mm (Abb. 4.1.4).

Setzt man die Messwerte an der Oberfläche für die Messung bei 420 nm (ca. 80 % Fluoreszenz) und für 680 nm (ca. 5 % Fluoreszenz) auf 100 %, nimmt die Stärke des zurückgeworfenen Fluoreszenzsignals verhältnismäßig um etwa 25 % je Millimeter ab. Dieser Zusammenhang beruht auf dem Lambert-Cosinus-Gesetz, nach dem sich Strahlung (hier sowohl die Intensität der Anregungsstrahlung als auch die der Fluoreszenzemission) bei zunehmender Entfernung pro Flächeneinheit verringert. Ein Einfluss des Umgebungslichtes kann dagegen aufgrund der niedrigen Folgefrequenz und eines zusätzlich eingebauten elektronischen Filters, der nur impulsförmige Signale durchlässt, auch bei einem Abstand der Sonde von der Probenoberfläche ausgeschlossen werden.

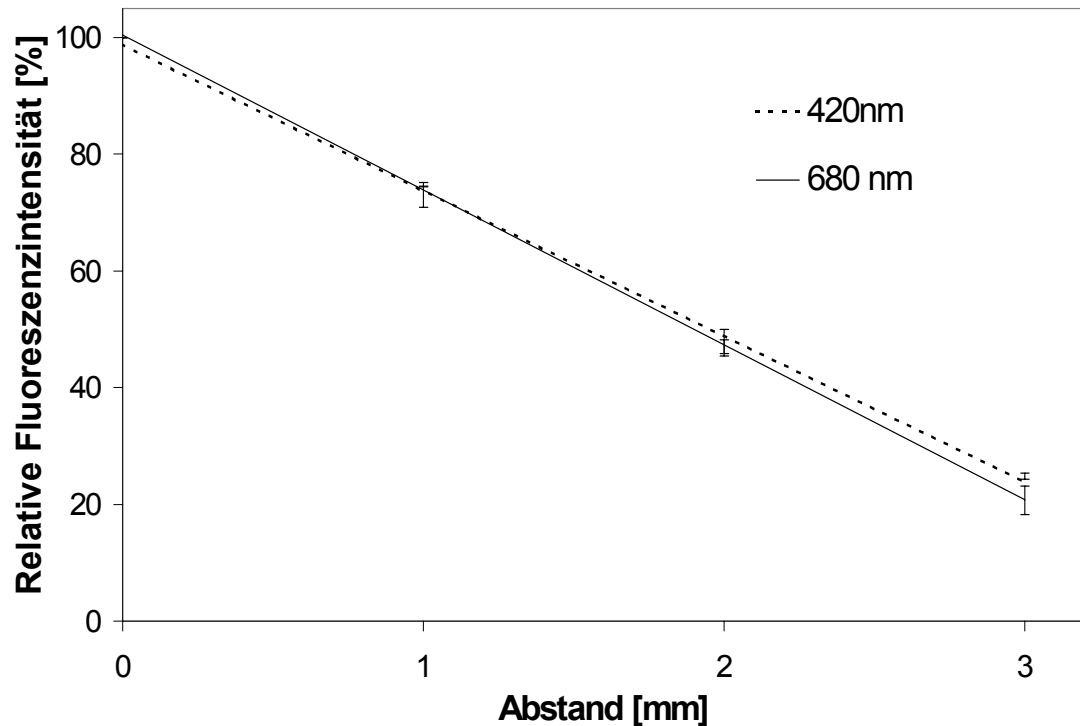


Abb. 4.1.4: Einfluss des Abstands der Sonde von der Probenoberfläche auf die Fluoreszenzintensität.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen die Sonde direkt auf die Probenoberfläche aufgelegt, um mit Hilfe der hohen messbaren Fluoreszenzintensität ein Maximum an Informationen aus der jeweiligen Probe erfassen zu können.

4.1.2 Einfluss der Umgebungsbedingungen

Temperatureinfluss

Messungen an denselben Äpfeln bei unterschiedlicher Fruchtfleischtemperatur zeigten eine nicht-lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität bei ansteigender Temperatur über das gesamte Spektrum von 350 nm bis 800 nm (Abb. 4.1.6).

Bei ansteigender Temperatur sind die Deaktivierungsmöglichkeiten der Moleküle im angeregten Zustand erhöht. Die strahlungslosen Prozesse im System nehmen zu und die Quantenausbeute wird verringert. Der spezifische Einfluss der Temperatur auf die biochemischen Reaktionen einzelner Fruchtinhaltsstoffe führt zu einer unterschiedlich ausgeprägten Veränderung des Fluoreszenzverhaltens im blauen und im roten Wellenlängenbereich.

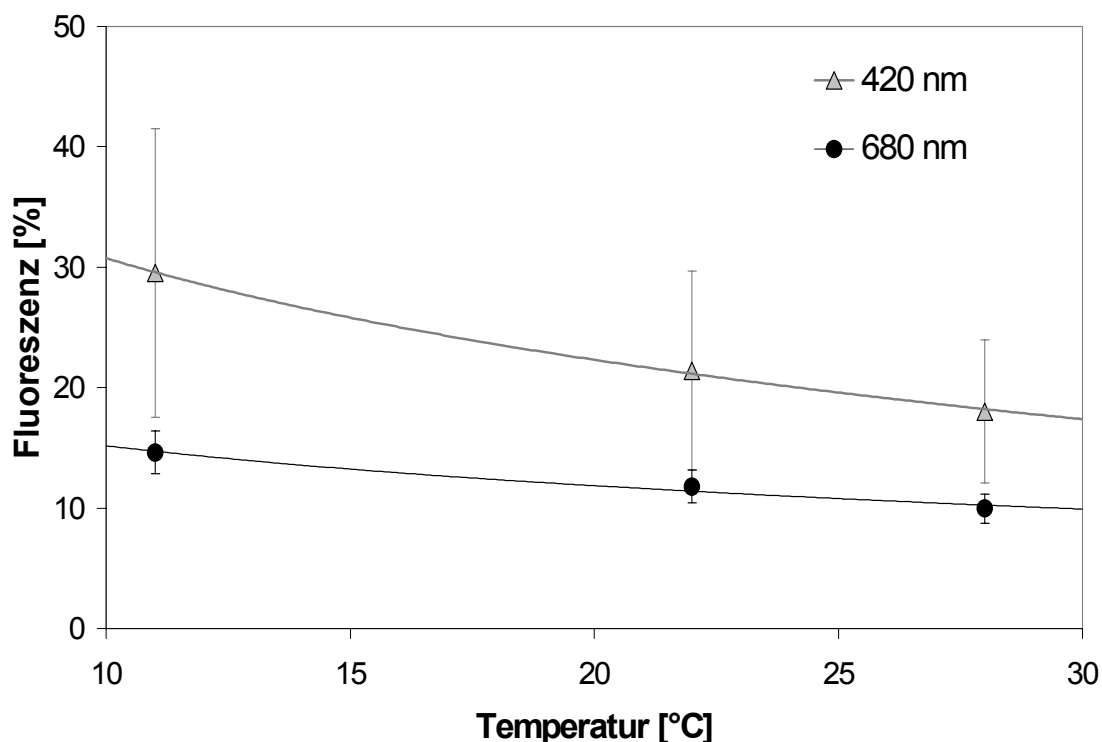


Abb. 4.1.6: Einfluss der Temperatur des Apfelfruchtfleisches auf die Fluoreszenzintensität.

Um temperaturbedingte Intensitätsveränderungen in den Fluoreszenzmessungen ausschließen zu können, wurden die Proben der nachfolgenden Versuche bei Raumtemperatur ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) gemessen.

pH-Einfluss

Der Vergleich von Fluoreszenzspektren von in Methanol gelösten Phenolstandards (Abb. 4.1.7) zeigt bei Kaffee- und Chlorogensäure einen hypsochromen *shift* (Intensitätsverschiebung in den kurzwelligeren Bereich) zwischen 8 nm bis 10 nm bei einer Änderung des *pH*-Wertes in den neutralen bzw. leicht basischen Bereich. Diese Verschiebungen in Richtung kürzerer Wellenlängen werden von einer 10 bis 15%igen Abnahme der Fluoreszenzintensität begleitet. Es kann angenommen werden, dass die Änderung des *pH*-Wertes der Lösung bei den schwachen Säuren (Säurekonstante pK_a im Bereich um 16,0) zur Protonenabspaltungen der Säuregruppe am Fluorophor führen. Die Intensitätsveränderungen im sauren *pH*-Bereich zwischen der bereits sauren Ausgangslösung und der mit Salzsäure verdünnten Standardlösungen erscheinen nur geringfügig und können durch eine Verschiebung des chemischen Gleichgewichts und wiederum entsprechender Dissoziation entsprechend dem Massenwirkungsgesetz erklärt werden. Auch sind keine Wellenlängenverschiebungen in den Spektren zu erkennen. Entsprechende Ergebnisse wurden für Ferulasäure gefunden.

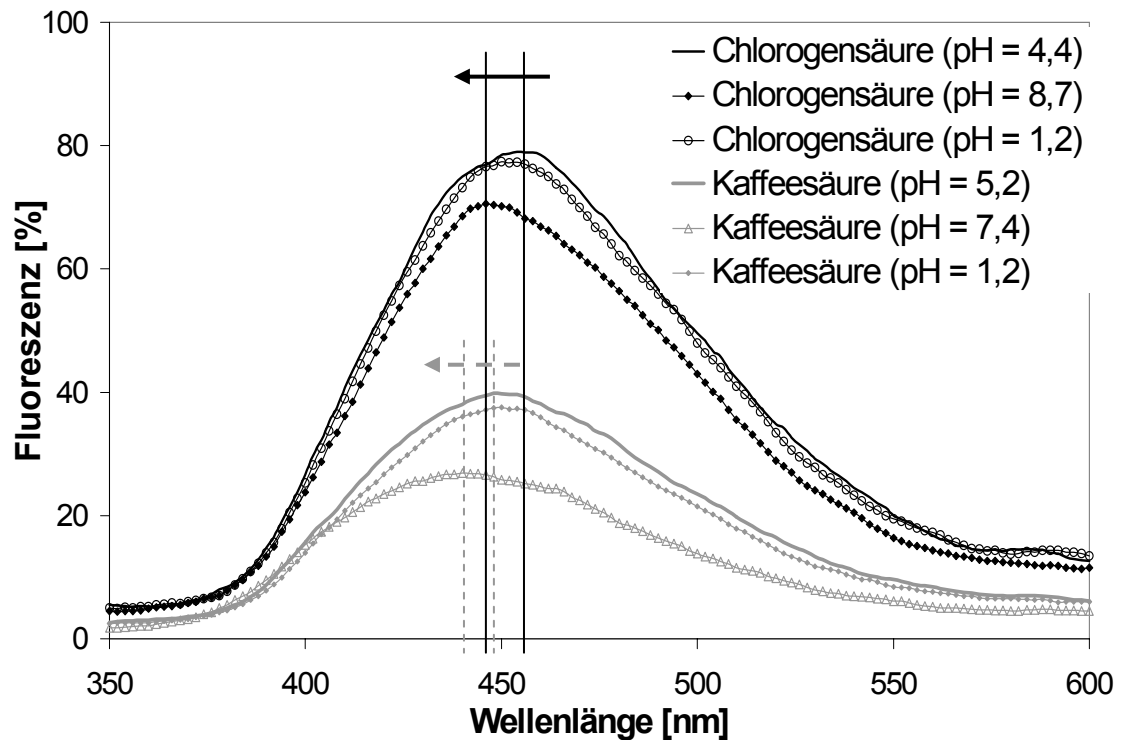


Abb. 4.1.7: Einfluss des *pH*-Wertes auf das Fluoreszenzsignal von Phenolsäuren.

Bleachingeffekt

Mit Hilfe der mehrfachen Messung ($n = 40$) von Fluoreszenzspektren an derselben Stelle der Apfelfruchtschale wurde der Einfluss einer wiederholter Bestrahlung mit *UV*-Laserlicht ($1 \mu\text{J}$) auf die Fluoreszenzintensität erfasst werden (Abb. 4.1.5).

In der Datenauswertung wurde die Fluoreszenzintensität der Startmessung auf 100 % und die folgenden Messungen relativ hierzu normiert. Da von einem unterschiedlichen Verhalten der einzelnen, im Apfel enthaltenen Fluorophore auf die wiederholte Strahlung ausgegangen werden kann, wurden die Fluoreszenzintensitäten an den Wellenlängen 420 nm und 680 nm separat betrachtet. Der wiederholte Energieeintrag führte an beiden Wellenlängen zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals, d.h. zu einer reduzierten Fluoreszenzfähigkeit der im Apfel enthaltenen Fluorophore zu fluoreszieren, dem sogenannten Ausbleichen (*Bleaching*-Effekt). Die Intensitätsminderung der Fluoreszenz ist im blauen Wellenlängenbereich nach mehrfacher Anregung stärker ausgebildet als im roten. Bei 420 nm war die Intensität auf 60 % der anfänglich gemessenen Intensität der Fluoreszenz abgefallen, bei 680 nm auf 75 %. Um den *Bleaching*-Effekt so gering wie möglich zu halten, wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen jeweils nur ein Spektrum je Messpunkt an der Frucht aufgezeichnet.

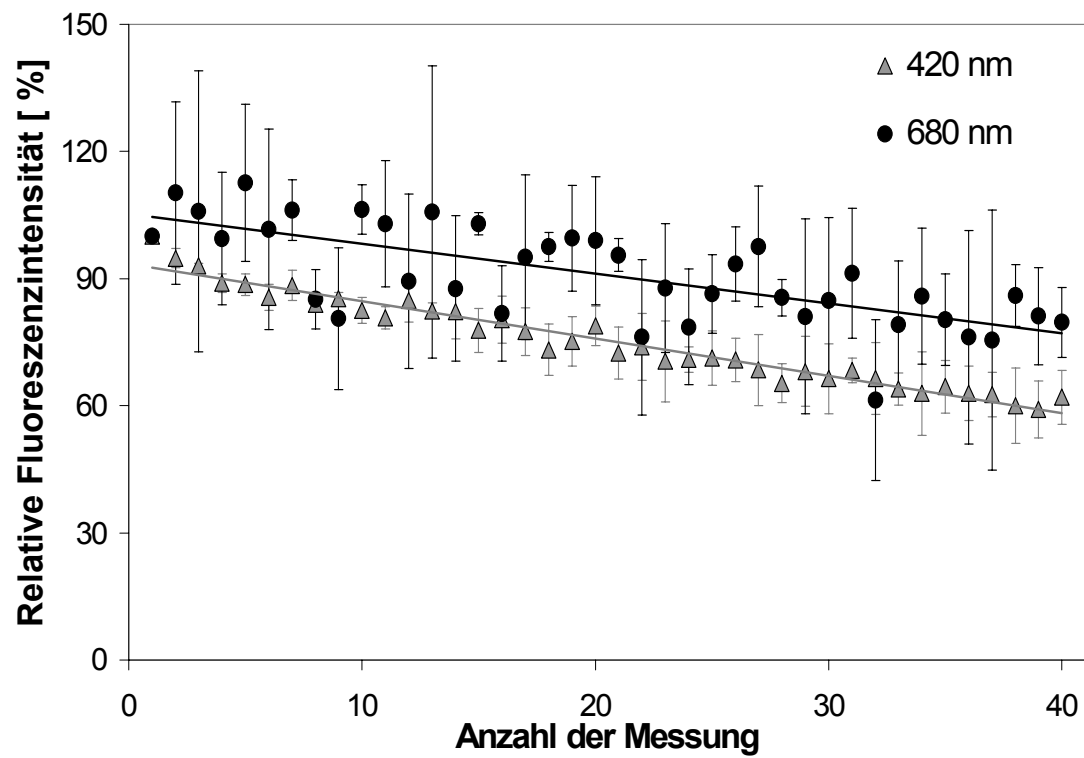


Abb. 4.1.5: Einfluss mehrfacher laser-induzierter Fluoreszenzmessung auf die Fluoreszenzintensität (gemessen an der grünen Fruchtschale des Apfels).

4.2 Varianzanalyse der Fluoreszenz von Gartenbauprodukten

4.2.1 Fluoreszenzsignal

Laser-induzierte Fluoreszenzmessungen wurden an verschiedenen Gartenbauprodukten getestet. Die gemessenen Fluoreszenzspektren sind grundsätzlich immer Summenspektren aus den fluoreszierenden Inhaltsstoffen der Produkten (Abb. 4.2.1).

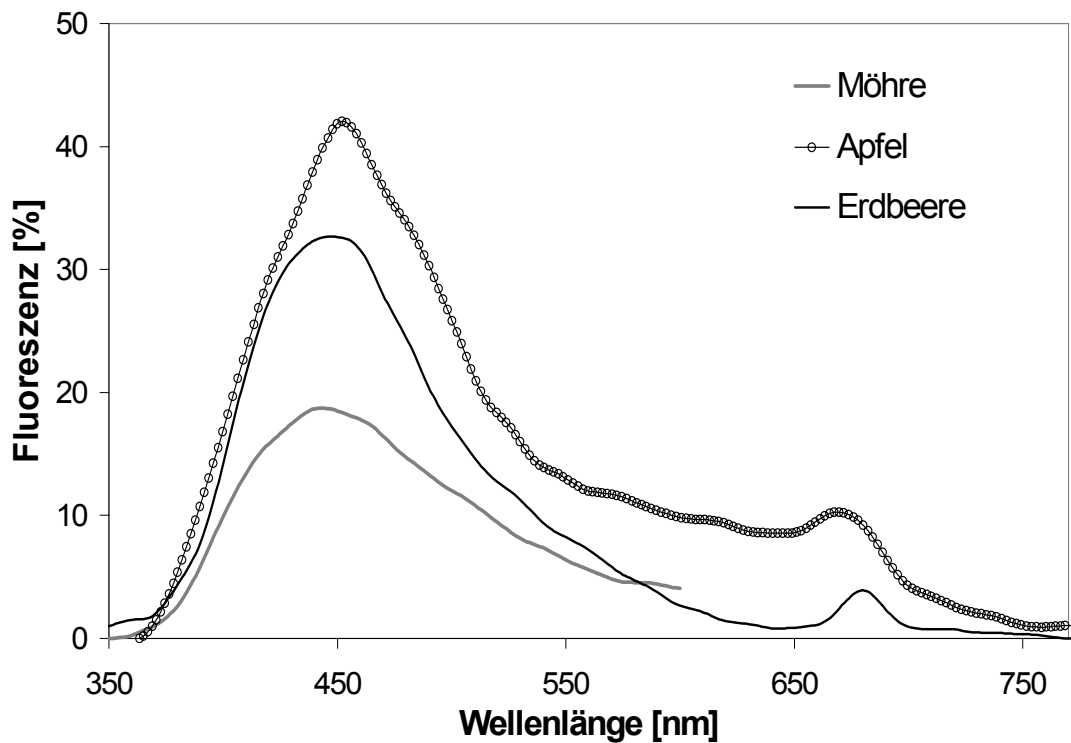


Abb. 4.2.1: Fluoreszenzspektren gemessen mit Hilfe der laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie an Apfel, Möhre und Erdbeere.

Einzelne Wellenlängenbereiche lassen jedoch bereits auf bestimmte fluoreszierende Molekülgruppen schließen. Die im roten Wellenlängenbereich auftretenden Fluoreszenzsignale können vor allem auf die Anwesenheit von den fluoreszierenden Chlorophyllen (Abb. 4.2.2), die im blau-grünen auf die in den Früchten enthaltenen polyphenolischen Verbindungen zurückgeführt werden (Abb. 4.2.3).

Die Chlorophylle absorbieren in Lösung stark in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 480 nm und um 660 nm. Die maximale Fluoreszenzemission von Chlorophyll liegt bei 680 nm (Abb. 4.2.2). Die im blau-grünen Bereich emittierte Fluoreszenzstrahlung kann somit *in vivo* von den Chlorophyllen reabsorbiert werden. Die im Apfel enthaltenen Carotinoide, hier am Beispiel von β -Carotin dargestellt, haben eine maximale Absorption bei 400 nm bis 500 nm, die Anthocyane (z.B. Malvidin) absorbieren haupt-

sächlich zwischen 480 nm bis 580 nm. Diese beiden Pigmentgruppen fluoreszieren selbst nicht. Sie haben aber aufgrund der Filterwirkung des Anregungslichtes einen Einfluss auf die Anregungs- sowie Emissionsspektren der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fluorophore.

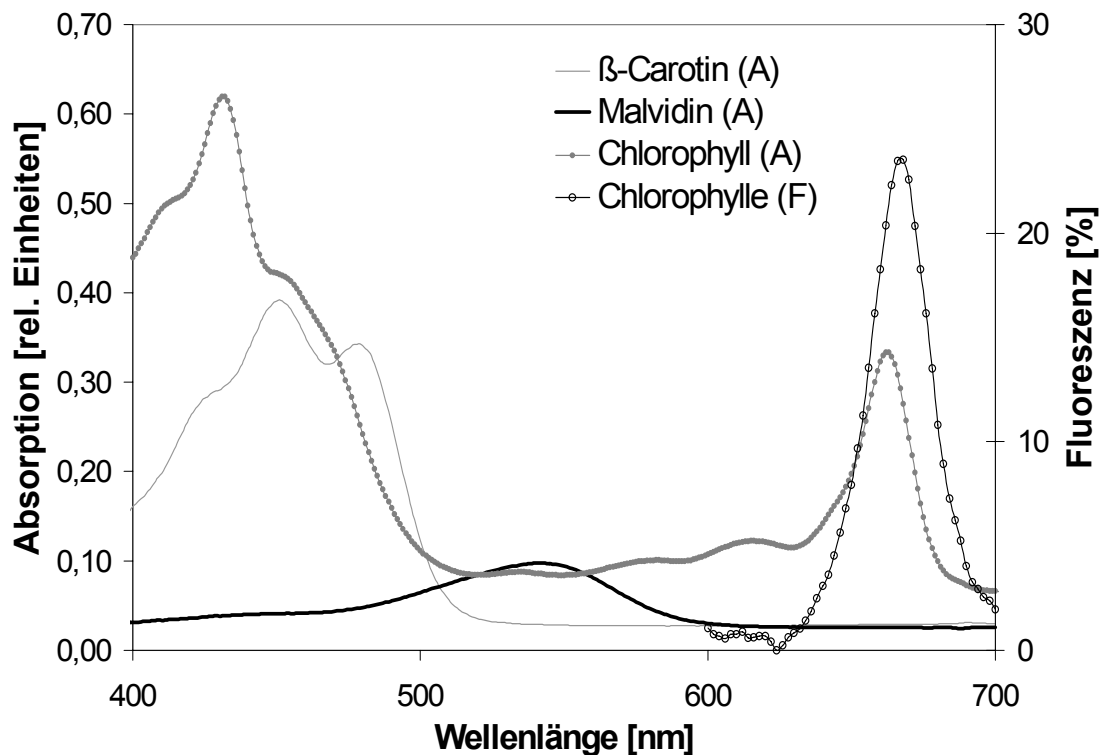


Abb. 4.2.2: Absorptions- (A) und Fluoreszenzspektren (F) von Chlorophyll, β -Carotin und Malvidin (gelöst in Ether).

In Apfelfrüchten häufig enthaltenen phenolischen Verbindungen der Hydroxyzimtsäuren wie Kaffee- und Chlorogensäure fluoreszieren im blauen Wellenlängenbereich und absorbieren hauptsächlich zwischen 200 nm bis 250 nm und 300 nm bis 350 nm (Abb. 4.2.3). Das Catechin absorbiert bei 210 nm bzw. 280 nm, es hat jedoch sein Fluoreszenzmaximum bei 310 nm. Somit kann die Emission der Catechinfluoreszenz von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hydroxyzimtsäuren wieder absorbiert werden. Auch nicht-fluoreszierende Moleküle wie das in Äpfeln nachweisbare Rutin, das eine Absorption im blau-grünen Wellenlängenbereich aufweist, beeinflusst das Apfelfluoreszenzspektrum. Auch hier ist der Einfluss wie schon zuvor bei Anthocyanen und Carotinoiden genannt, durch Reabsorption der Fluoreszenzemission sowie die Konkurrenz um das Absorptionslicht bedingt.

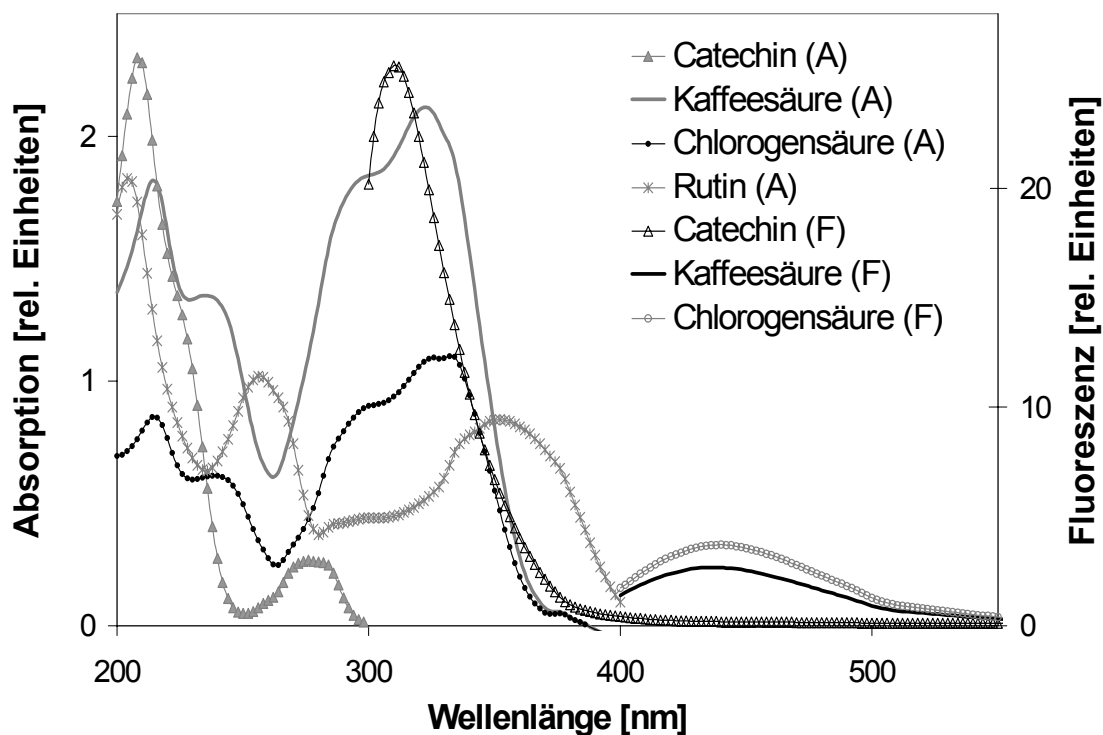


Abb. 4.2.3: Absorptions- (A) und Fluoreszenzspektren (F) von phenolischen Reinstsubstanzen gelöst in Methanol.

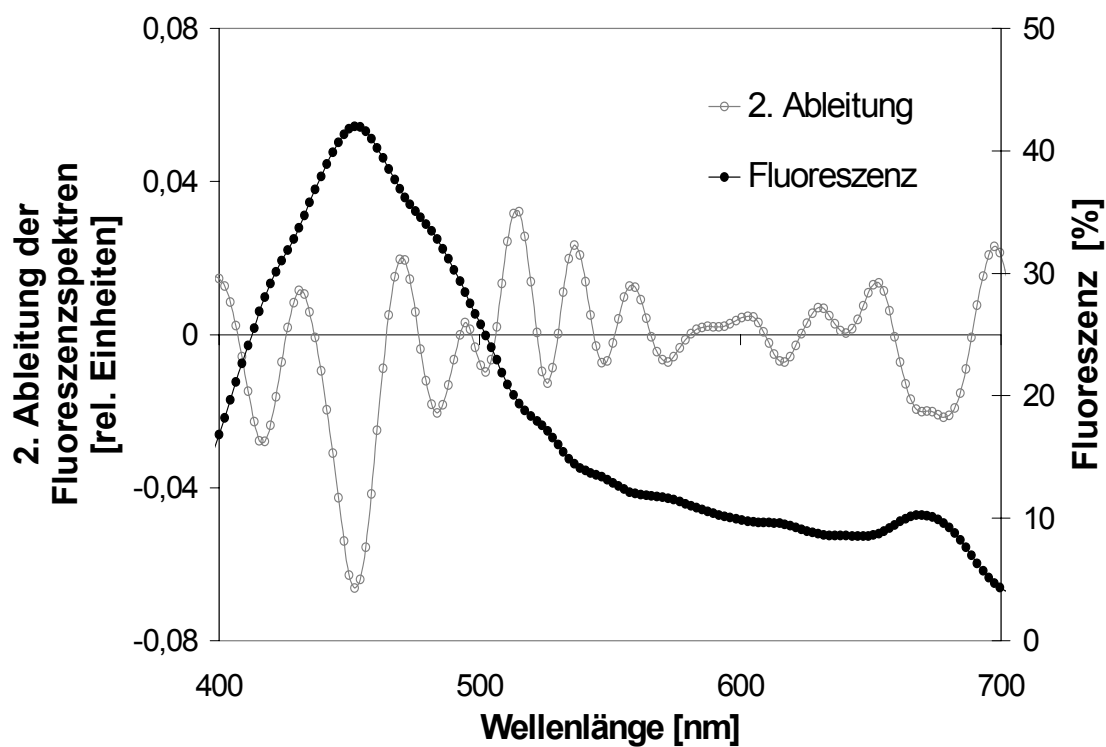


Abb. 4.2.4: 2. Ableitung und geglättete Fluoreszenzspektren gemessen mit Hilfe der laser-induzierten Fluoreszenzanalyse an Apfel, Möhre und Erdbeere.

Die Fluoreszenzspektren zeichnen sich im blau-grünen Wellenlängenbereich für alle untersuchten Produkte jeweils nur durch einen breiten *Peak* aus. Die Derivativspektroskopie wurde in diesem Zusammenhang angewendet, um in diesem Bereich die *Peaks* nach einzelnen Fluorophoren oder Fluorophorgruppen auflösen zu können. Durch die Anwendung der zweiten Ableitung auf die Spektren werden Extrema in den an Apfel der Sorte 'Elstar' gemessenen Fluoreszenzbanden deutlich, die möglicherweise auf einzelne Fruchtinhaltstoffe zurückgeführt werden könnten (Abb. 4.2.4).

Die separate Analyse einzelner Fluorophore ist jedoch durch die Überlagerung der Fluoreszenzsignale und Wechselwirkungen der Moleküle erschwert. In einem ersten Ansatz wurde daher getestet, ob mit Hilfe von Faktorenanalyse der Fluoreszenzspektren grundsätzliche Variationen in den Spektren in Abhängigkeit der Fruchtentwicklung festzustellen sind. Eine typische Anwendung in der Praxis könnte hier die Überwachung (*Monitoring*) von Früchten im Lager sein.

4.2.2 *Monitoring* im Lager

Signalvorverarbeitung für die Hauptkomponentenanalyse

In den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen wurde die Fluoreszenzspektroskopie als eine Methode für das qualitative *Monitoring* von Gartenbauprodukten während der Lagerung erprobt. Die Fluoreszenzmessung der Äpfel erfolgte mit einer Anregung bei 377 nm und 488 nm (Abb. 4.2.5).

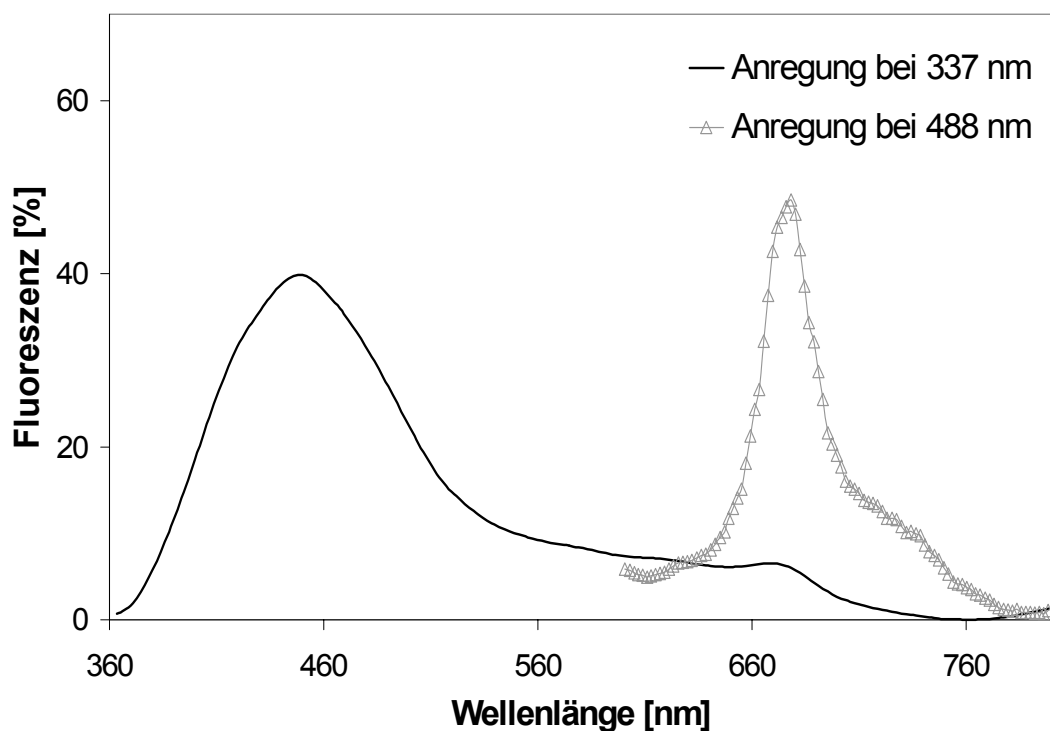


Abb. 4.2.5: Apfelfluoreszenzspektren angeregt mit monochromatischer Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge.

Die Daten wurden mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (*PCA*) ausgewertet. Betrachtet wurden der prozentuale Anteil der abgedeckten Varianz, die Anzahl der hierfür benötigten Hauptkomponenten (*PC*) und die *Loadings*.

Mit dem Ziel, eine geeignete Signalvorverarbeitung für die Auswertung der *PCA* zu ermitteln, wurden etablierte Methoden wie Glättung, Derivativbildung, Mittelwertzentrierung und Autoskalierung getestet. Der Einfluss der Vorverarbeitung auf die qualitative Fluoreszenzanalyse ist im Folgenden beispielhaft an einem Datensatz von *CA*-gelagerten Äpfeln der Sorte 'Elstar' dargestellt. Die Fluoreszenzspektren wurden mit blauer Strahlung (488 nm) angeregt und der rote Wellenlängenbereich für die Auswertung herangezogen, um insbesondere Veränderungen der in den Früchten enthaltenen Chlorophylle, die in diesem Bereich fluoreszieren, verfolgen zu können. Tendenziell ähnliche Ergebnisse wurden bei parallel durchgeführten Versuchsreihen an Äpfeln der Sorte 'Elstar' weiterer Anbauggebiete gefunden (Altes Land (Deutschland), Skierniewice (Polen)).

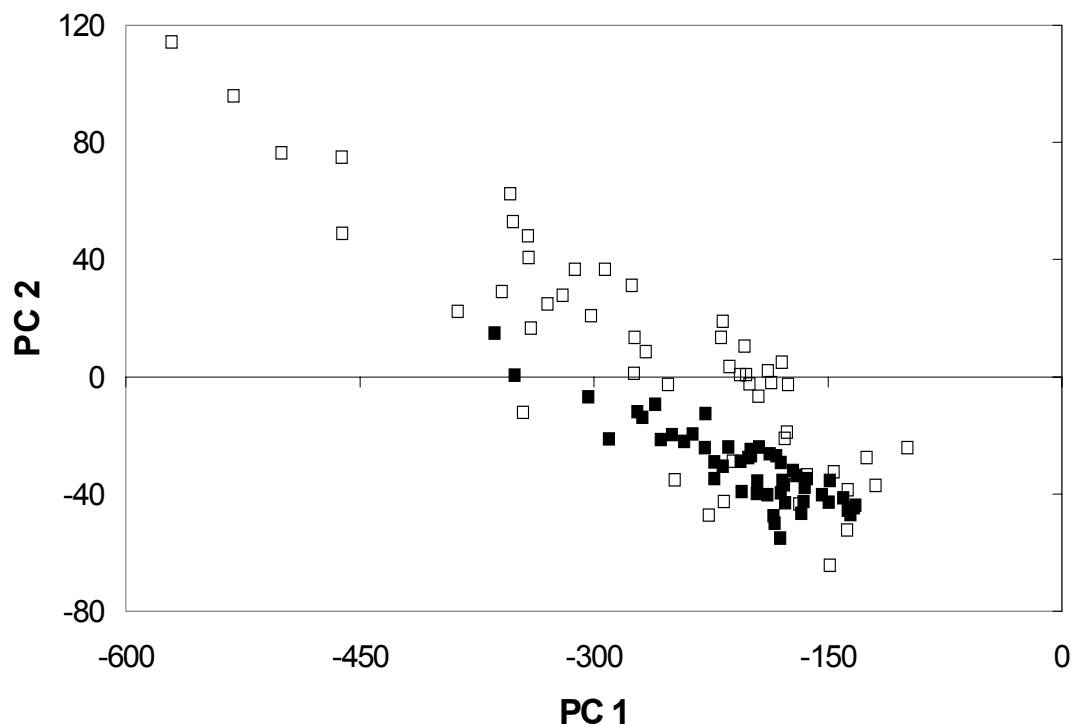


Abb. 4.2.6: *Scores* der Rohdaten mit 488 nm angeregter Fluoreszenzspektren von Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger *CA*-Lagerung.

Bei der Anwendung der Hauptkomponentenanalyse auf die Rohdaten wurde der Datensatz ($X_{100 \times 76}$) auf zwei Hauptkomponenten reduziert, die einen hohen prozentualen Anteil (97,00 %) der Varianz der Intensitäten entlang der Wellenlängen abdecken. In Abb. 4.2.6 ist der Datensatz der Proben (*Scores*) im von

$PC1$ (94,97 %) und $PC2$ (2,03 %) neu gebildeten Datenraum dargestellt. Ohne Vorverarbeitung der spektralen Daten ist aus den Ergebnissen der PCA entlang beider Hauptkomponenten eine Verringerung der Streuung der Datenpunkte von den gelagerten im Vergleich zu den frisch geernteten Früchten zu erkennen. Die Standardabweichung der $PC1$ -Scores wurde im Vergleich zur Einlagerung auf 35,32 % reduziert, die der $PC2$ -Scores auf 26,57 %. Bei der zweiten Hauptkomponente ($PC2$) kommt es zudem zu einer Verschiebung der Datenpunkte vom positiven (Einlagerung) in den negativen (Auslagerung nach zwei Monaten) Achsenabschnitt.

Werden die Fluoreszenzspektren vorab mit Hilfe eines gleitenden Mittelwerts über sieben Datenpunkte geglättet, ergeben sich kaum sichtbare Veränderungen in den $Scores$. Es wird in den ersten zwei Hauptkomponenten lediglich eine um 1,81 % erhöhte Gesamtvarianz erreicht ($PC1 = 97,39$ %, $PC2 = 1,42$ %) erreicht.

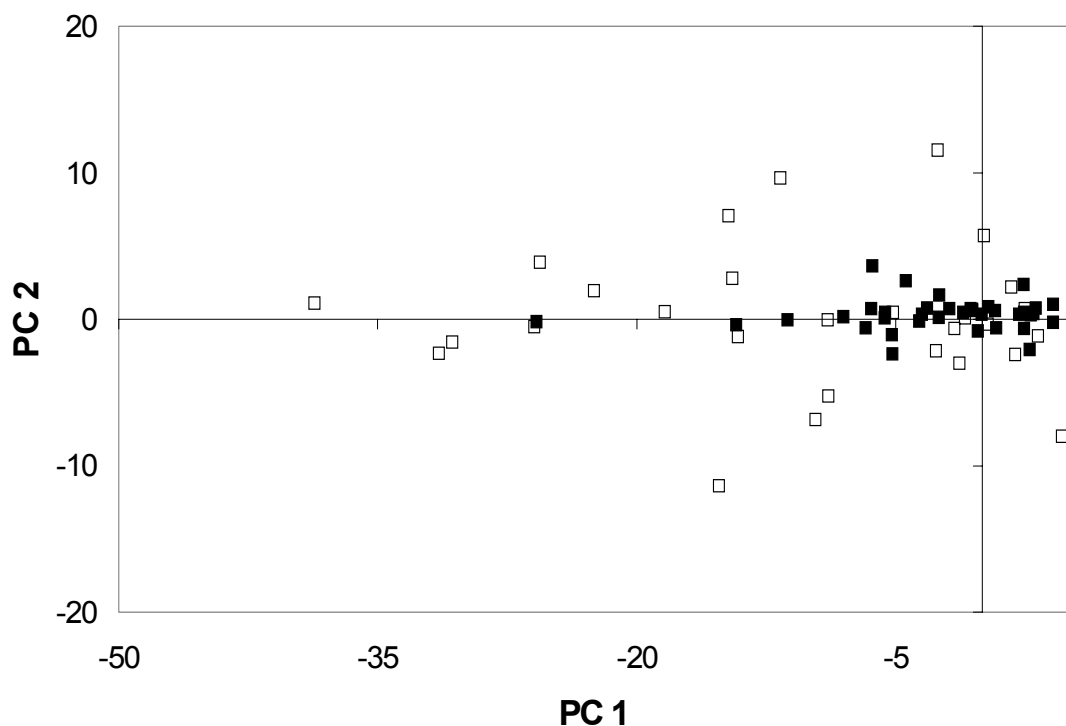


Abb. 4.2.7: $Scores$ der Hauptkomponentenanalyse von der ersten Ableitung der Rohdaten mit 488 nm angeregter Fluoreszenzspektren von Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger CA -Lagerung.

Als eine weitere Methode der Signalvorverarbeitung wurde die Derivativspektroskopie getestet. Bei der Anwendung der Hauptkomponentenanalyse auf der ersten Ableitung der Fluoreszenzspektren ist im Vergleich zur Verwendung der Rohdaten keine eindeutige Unterscheidung der Proben zwischen der Einlagerung und der ausgelagerten Äpfel möglich (Abb. 4.2.7). Für die Analyse wurden zwei PC verwendet, die 86,79 % der Variation in den Fluoreszenzspektren abdecken ($PC1 = 84,35$ %, $PC2 = 2,44$ %). Die Haupt-

komponentenanalyse, die auf der zweiten Ableitung der Rohdaten gebildet wurde, deckt mit zwei *PC* eine Varianz von 88,49 % ab (Abb. 4.2.8). Die Daten sind auf den Ursprung des *Scores*-Datenraums konzentriert und eine Unterscheidung zwischen gelagerten und ungelagerten Äpfeln ist kaum möglich.

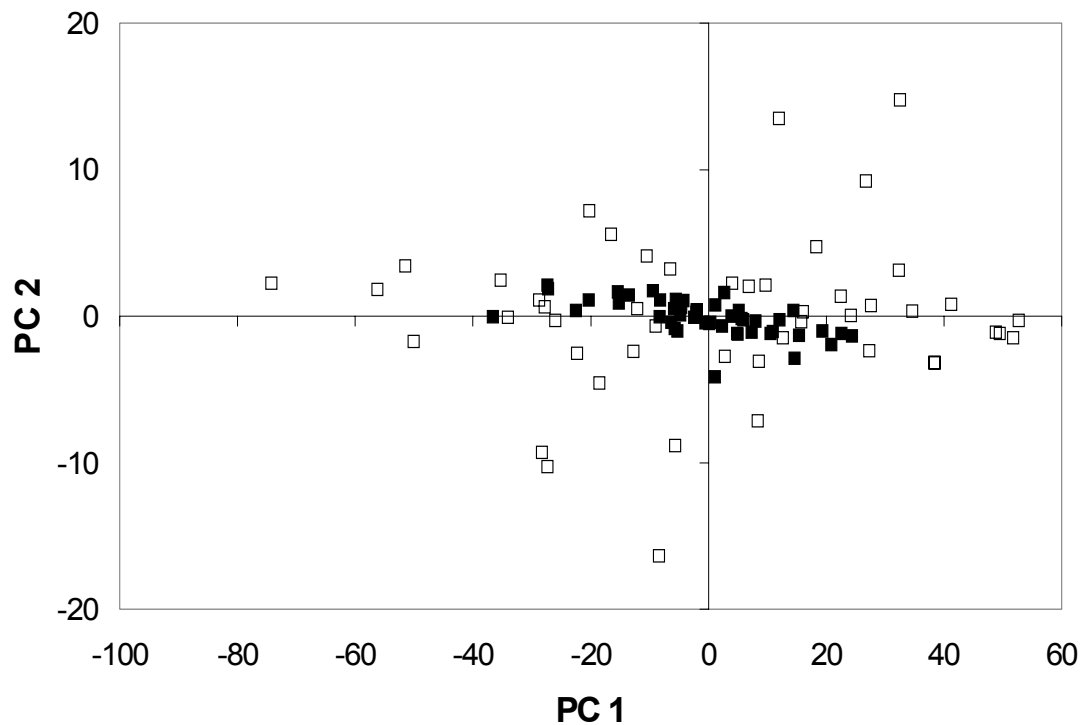


Abb. 4.2.8 *Scores* der zweiten Ableitung der Rohdaten mit 488 nm angeregter Fluoreszenzspektren an den Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger *CA*-Lagerung.

Auffällig bei der Verwendung der Derivativspektroskopie als Signalvorverarbeitungsmethode ist eine Erhöhung der Streuung der Daten im *PCA*-Datenraum mit steigendem Grad der Ableitung.

Im Folgenden wurden Methoden der Normierung als Signalvorverarbeitung eingesetzt. Zunächst wurde hierzu der Mittelwert jeder Wellenlänge ($m = 76$) über die Proben ($n = 100$) gebildet und dann von dem jeweiligen Wellenlängenwert jeder einzelnen Probe (MZ_P) abgezogen. Dadurch verschiebt sich der Schwerpunkt des Datenraums zum Ursprung (Abb. 4.2.9). Der Datensatz ($X_{100 \times 76}$) wurde auf drei Hauptkomponenten reduziert, die 85,53 % der Gesamtvarianz abdecken. Die Daten streuen um den Ursprung von *PC1* (80,37 % der Varianz), eine "Konzentrierung" der gelagerten Früchte ist erkennbar. Entlang von *PC2* (3,00 %) werden sie hingegen deutlich vom positiven in den negativen Achsenabschnitt verschoben. Zudem ist eine Abnahme der Streuung der Daten nach der *CA*-Lagerung im Vergleich zur Einlagerung erkennbar. Die Standardabweichung der *Scores* wurde entlang *PC1* im Vergleich zur Einlagerung um 53,93 % reduziert, während bei *PC2* eine Reduzierung um 26,98 % vorlag.

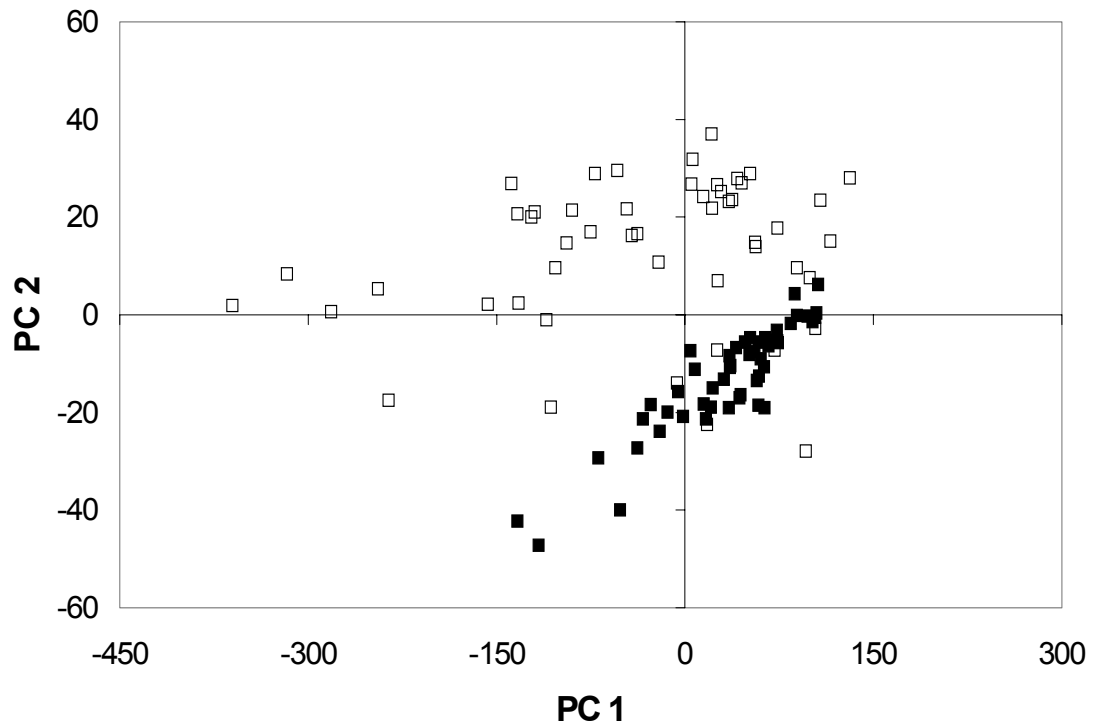


Abb. 4.2.9: *Scores* nach MZ_P der Rohdaten der mit 488 nm angeregt Fluoreszenzspektren an den Äpfeln vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger CA-Lagerung.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der PCA nach MZ_P führt das Modell, welches auf Grundlage der Autoskalierung über die Proben ($AUTO_P$) gebildet wurde, zu einer weniger deutlichen Trennung der Datenpunkte, vor allem bezogen auf die zweite Hauptkomponente (Daten nicht dargestellt). Zudem werden für die Modellierung deutlich mehr Hauptkomponenten ($n = 8$) benötigt, wobei die ersten beiden PC nur noch 59,93 % der Varianz der Intensität über die Wellenlängen abdecken. Die Mittelwertzentrierung und die Autoskalierung über die Wellenlängen (MZ_λ , $AUTO_\lambda$) wurden ebenfalls getestet. Sie erzielten jedoch keine nennenswerte Verbesserung in der Separierung der *Scores* vor und nach der Lagerung.

Für Apfellagerversuch war somit MZ_P als Signalvorverarbeitungsmethode für die Hauptkomponentenanalyse bei hoher Abdeckung der Gesamtvarianz und einer geringen Anzahl an PC geeignet für die Unterscheidung der Äpfel vor und nach der Lagerung. Dementsprechend wurde eine Kombination dieser Normierung mit der vorherigen Glättung der Originalspektren erprobt. Sie führte zu einem verbesserten Modell mit zwei Hauptkomponenten, die 96,43 % der Varianz der Intensitäten entlang der Wellenlängen erklärten. Die *Loadings* beider Modelle im Vergleich (Abb. 4.2.10) machen deutlich, dass durch die Glättung vor der Modellierung das Rauschen reduziert wurde (Abb.4.2.11). Während die Gewichtung der ersten Hauptkomponente auf der Intensitätsverminderung liegt und die geringeren Fluoreszenzintensitäten zum positiven Achsenabschnitt hin verschiebt, werden mit Hilfe der zweiten PC zudem spektrale Verschiebungen, die während der Lagerung auftreten, in das Modell mit einbezogen. Die vorherige Glättung

der Daten führt nach anschließender MZ_P zu besseren Ergebnissen in der Hauptkomponentenanalyse, dennoch wurde auf diese zusätzliche Vorverarbeitung verzichtet, um die in den Originalspektren zusätzlich enthaltenen Informationen nicht zu verlieren.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den blau-grünen Wellenlängenbereich bei einer Anregung mit 337 nm gefunden. Der Rohdatensatz zeigte eine ähnliche Verteilung in den *Scores* wie bei der Anregung mit 488 nm und deckte mit zwei Hauptkomponenten 99% der Varianz in der *X*-Matrix ab. Eine Glättung der Spektren führte zu einer Verbesserung von 0,51 % der Gesamtvarianz. $AUTO_P$ reduzierte den Datensatz im Gegensatz zu MZ_P auf mehr ($n = 4$) Hauptkomponenten, die vergleichsweise weniger Prozent (71,99 %) der Varianz in den Fluoreszenzspektren abdeckten.

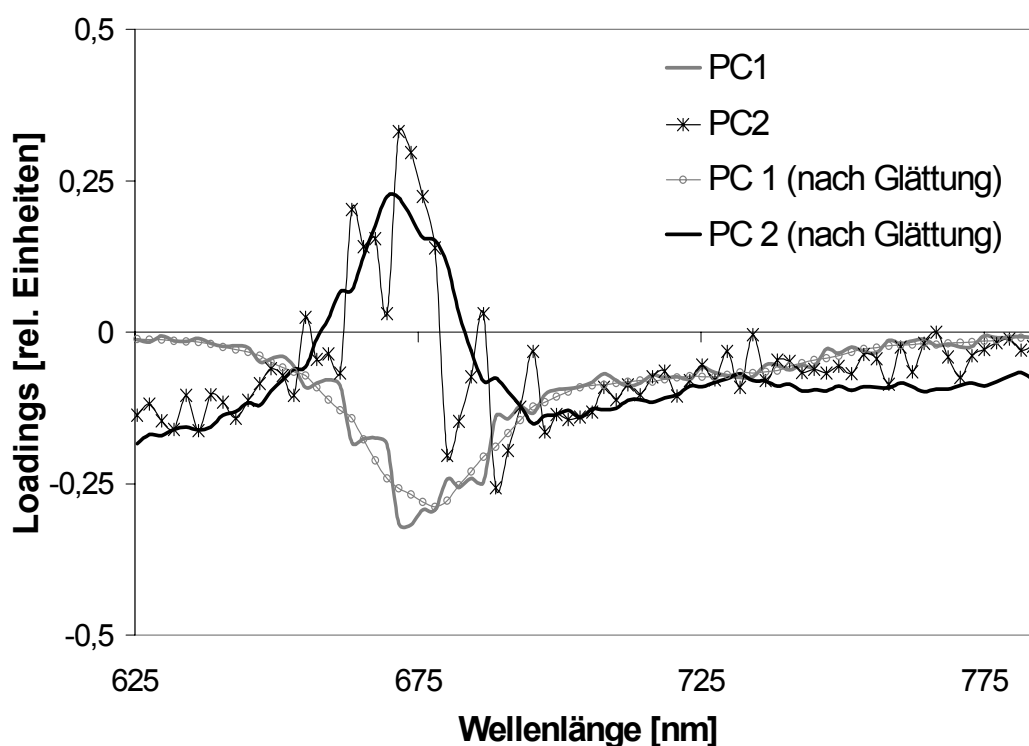


Abb. 4.2.10: *Loadings* der ersten zwei *PC* nach MZ_P mit und ohne vorherige Glättung der Originalspektren.

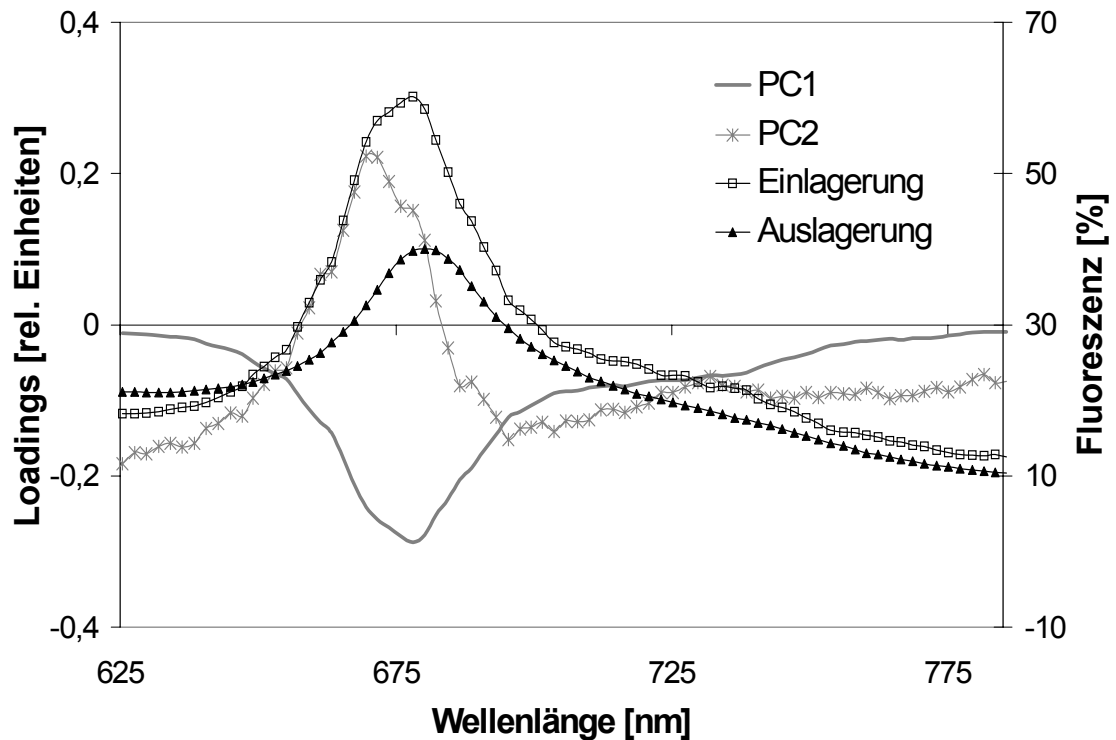


Abb. 4.2.11: *Loadings* der ersten zwei PC nach MZ_P nach Glättung und Mittelwerte der geglätteten Apfelfluoreszenzspektren gemessen vor (Einlagerung) und nach der CA -Lagerung (Auslagerung).

Lagerung von Äpfeln

Für das Monitoring von Äpfeln im CA -Lager wurden im folgenden Versuch die Fluoreszenzspektren mit 337 nm angeregt, um lagerungsbedingte Veränderungen fluoreszierender und absorbierender Fruchthaltstoffe im blau-grünen Wellenlängenbereich erfassen zu können.

Nachdem MZ_P als eine geeignete Signalvorverarbeitung für die Hauptkomponentenanalyse herausgearbeitet wurde, wurden in den nachfolgenden Versuchsauswertungen die Daten dementsprechend vorbehandelt.

Die Versuchsreihen an frisch geernteten und zwei Monate in kontrollierter Atmosphäre gelagerten Äpfeln der Sorte 'Elstar' wurden im Jahr 2002 durchgeführt. In Abb. 4.2.12 sind die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse des Lagerversuchs bei einer Anregung mit 337 nm dargestellt. Der Datensatz ($X_{94 \times 176}$) wurde auf drei PC reduziert, die 84,82 % der Gesamtvarianz abdecken. Die zweite Hauptkomponente (12,20 % der Varianz) ermöglicht eine grobe Gruppierung der frischen Äpfel im positiven und der nach der CA -Lagerung gemessenen Früchte im negativen Achsenabschnitt. Im Vergleich zur Anregung der Spektren mit blauer Strahlung lassen die *Loadings* von $PC1$ und $PC2$ (Abb. 4.2.13) eine Gewichtung im blau-grünen Wellenlängenbereich erkennen. Es wird angenommen, dass vor allem die in den Äpfeln ent-

haltenen Chlorophylle, Carotinoide, und Polyphenole maßgeblich auf die Fluoreszenzemission einwirken. Die durch die Anregung mit *UV*-Strahlung (337 nm) hervorgerufenen spektralen Unterschiede weisen der Chlorophyllfluoreszenz im roten Wellenlängenbereich nur einen sehr geringen Einfluss auf die Veränderungen während der Lagerung zu.

Die Ergebnisse der Anregung mit blauer (488 nm) und mit ultravioletter (337 nm) Strahlung zeigen analoge Tendenzen in der graphischen Auswertung und decken mit und ohne Glättung vor der *PCA* vergleichbare Varianzen ab. Mit Hilfe der Anregung im *UV*-Bereich können über die lagerungsbedingten Chlorophyllveränderungen hinaus auch die Einflüsse der im blau-grünen Wellenlängenbereich fluoreszierenden und absorbierenden Inhaltsstoffe der Früchte wie Carotinoide, Anthocyane, Polyphenole berücksichtigt werden.

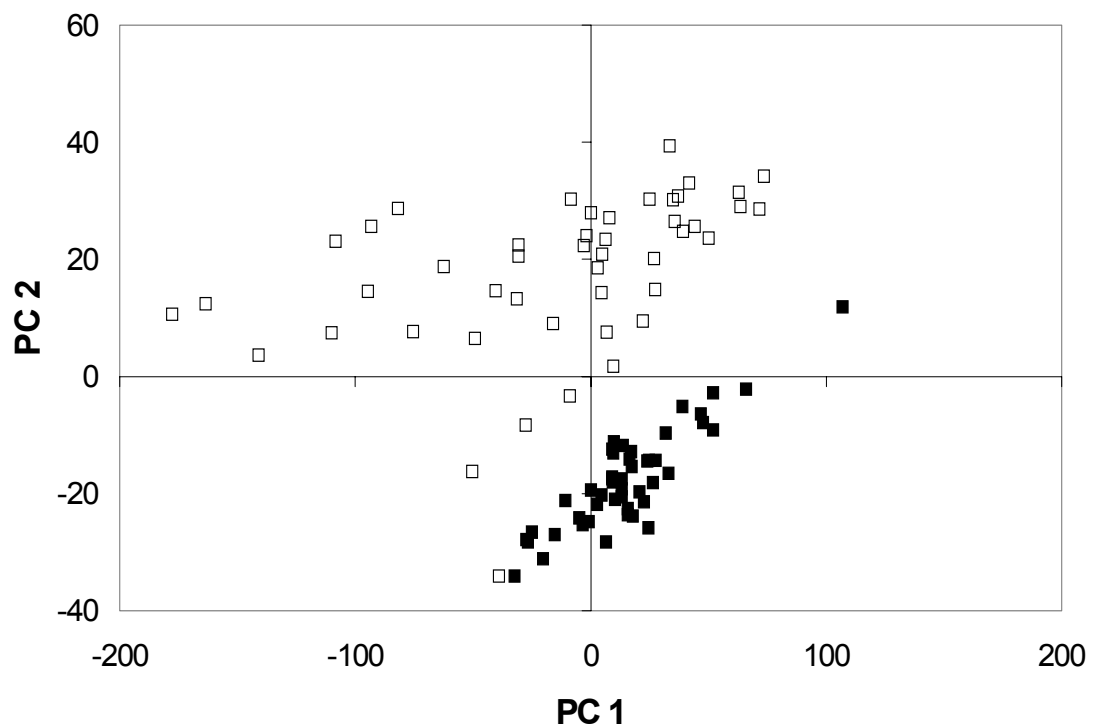


Abb. 4.2.12: Scores nach MZ_P der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Apfelfluoreszenzspektren vor (weiß) und nach (schwarz) zweimonatiger *CA*-Lagerung.

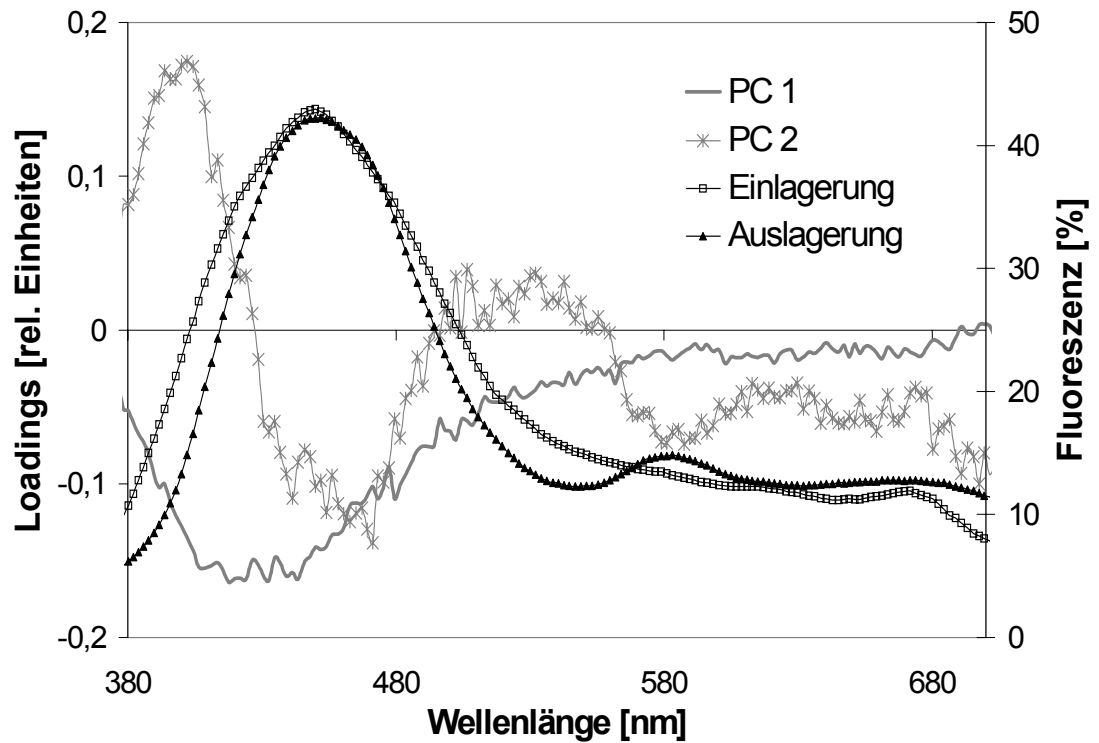


Abb. 4.2.13: *Loadings* der ersten zwei *PC* nach MZ_P der Rohdaten und Mittelwerte der mit 337 nm angeregten und geglätteten Apfelfluoreszenzspektren gemessen vor (Einlagerung) und nach der *CA*-Lagerung (Auslagerung).

Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Apfelfruchtschale wird neben dem Genom maßgeblich bestimmt von der Sonneneinstrahlung. Um die Verteilung der absorbierenden und re-emittierenden Inhaltsstoffe in der Fruchtschale während des Monitorings im Lager zu berücksichtigen, wurde in dem folgenden Versuch der zwei und vier Monate kühlgelagerten Äpfel der Sorte 'Elstar' aus den Versuchsreihen des Jahres 2003 zwischen der mit *UV*-Strahlung angeregten Fluoreszenzmessung auf der Sonnen- (rot) und der Schattenseite (grün) der Frucht unterschieden. Abb. 4.2.14 stellt die *Scores* der mit zwei Komponenten gebildeten *PCA* der Messungen auf der grünen Seite dar, wobei *PC1* 86,61 % der Varianz der Intensitäten entlang der Wellenlängen abdeckt und *PC2* 2,46 %. Die graphische Auswertung lässt eine diagonale Verschiebung von den ungelagerten Äpfeln (links unten) hin zu den Proben nach der zweiten Auslagerung (rechts oben) entlang beider Hauptkomponenten erkennen. Bei den Fluoreszenzspektren der roten Seite der Äpfel werden 80,18 % der Gesamtvarianz in den Daten mit Hilfe der zwei Hauptkomponenten abgedeckt (Abb. 4.2.15). Aufgrund der verringerten Ausgangsstreuung der Daten auf der Sonnenseite ist der Verlauf der Lagerung, der dem auf der grünen Seite entspricht, besser zu erkennen (Tab. 4.2.1).

Tab. 4.2.1: Standardabweichungen der *Scores* der Hauptkomponentenanalyse der Fluoreszenzspektren gemessen auf der grünen und der roten Seite der Äpfel.

	Grüne Seite				Rote Seite			
	PC1 [r.E.]	PC1 [%]	PC2 [r.E.]	PC2 [%]	PC1 [r.E.]	PC1 [%]	PC2 [r.E.]	PC2 [%]
Einlagerung	16,84	100	2,68	100	8,67	100	3,12	100
1. Auslagerung	8,06	47,85	2,04	76,15	5,42	62,54	1,77	56,78
2. Auslagerung	16,26	96,54	2,46	91,99	11,13	128,45	3,43	109,72

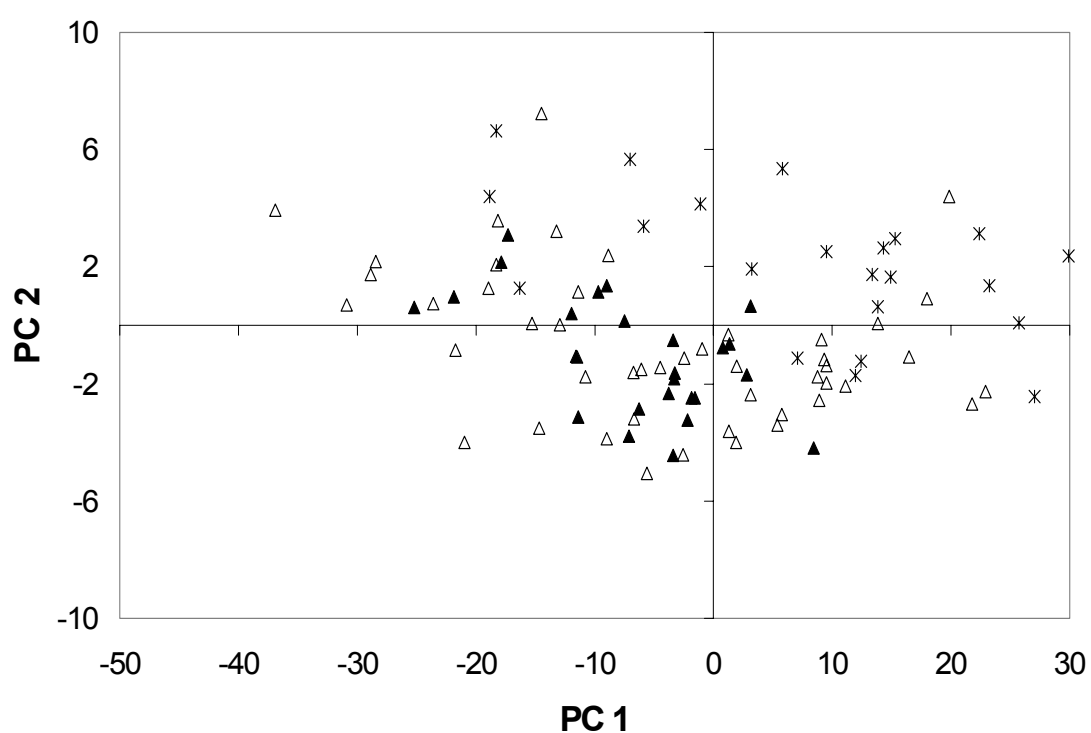


Abb. 4.2.14: *Scores* nach MZ_P der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Apfelfluoreszenzspektren auf der grünen Seite vor (Δ), nach zweimonatiger (\blacktriangle) und nach viermonatiger Kühlagerung (*).

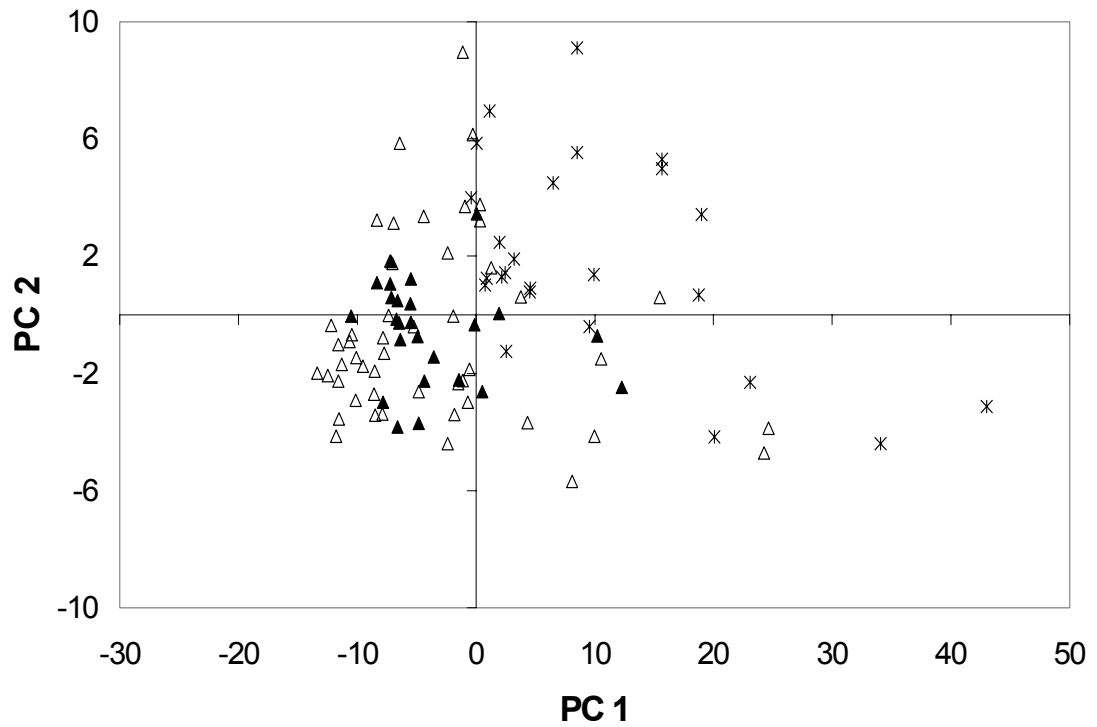


Abb. 4.2.15: Scores nach MZ_P der Rohdaten mit 337 nm angeregter Apfelfluoreszenzspektren auf der roten Seite vor (Δ), nach zweimonatiger (\blacktriangle) und nach viermonatiger Kühlung (*).

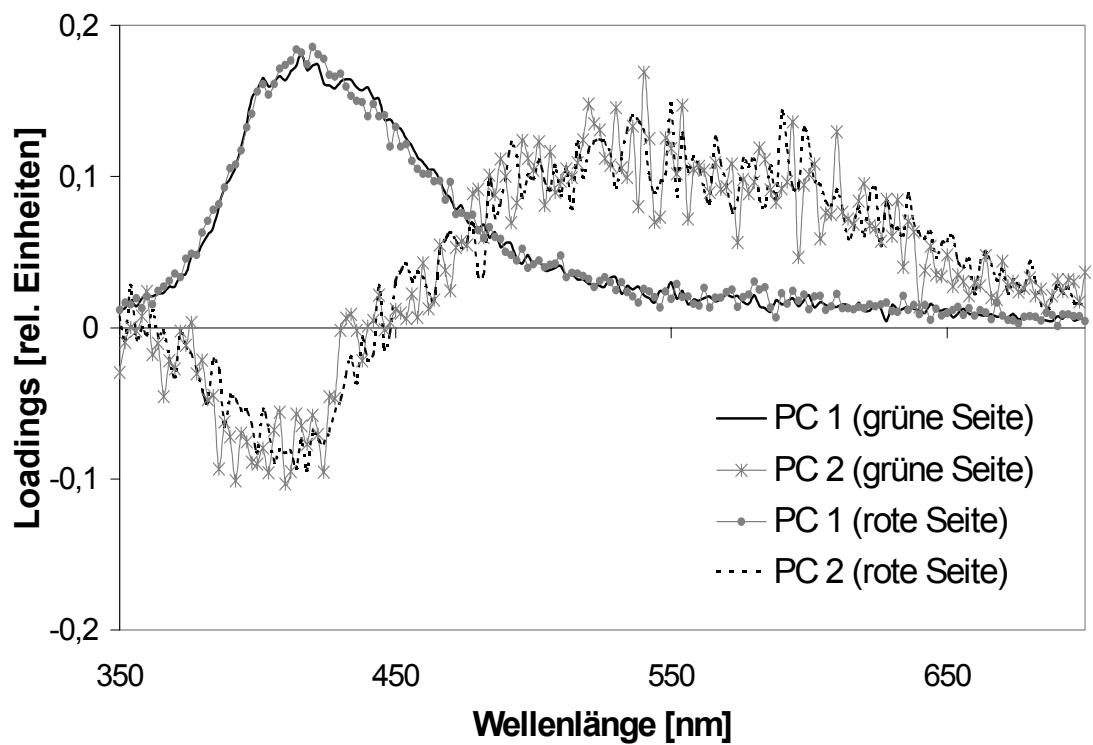


Abb. 4.2.16: Loadings der ersten zwei PC nach MZ_P der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Fluoreszenzspektren der Sonnen- und der Schattenseite kühlgelagerter Äpfel.

Die *Loadings* beider Modelle zeigen hingegen keine erkennbaren Unterschiede (Abb. 4.2.16). Die erste Hauptkomponente hat ihren Schwerpunkt im blau-grünen Wellenlängenbereich. Die Gewichtungen der zweiten *PC* liegt im Gegensatz zu den Ergebnissen der *CA*-Lagerung gleichermaßen im rein blauen (400 - 450 nm) als auch im grünen bis roten (520 – 650 nm) Bereich.

Bei beiden Analysen fällt eine verringerte Verbreitung der Datenpunktwolke im *Scores*-Datenraum nach zweimonatiger Lagerung im Vergleich zu frisch geernteten Äpfeln auf. Nach weiteren zwei Monaten Lagerung nimmt die Streuung der Daten hingegen wieder zu.

Lagerung von Möhren

Bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerte Möhren wurden zur Erprobung eines Monitorings während der Lagerung analog zu den Versuchen an Äpfeln einer Fluoreszenzanalyse unterzogen. Die gemessenen Spektren ($X_{158 \times 126}$) wurden mit Hilfe der *PCA* und MZ_P auf zwei Hauptkomponenten reduziert, die 93,21 % der Varianz der Intensitäten entlang der Wellenlängen abdecken. Bei vierwöchiger Lagerung bildete sich eine diagonale Verschiebung der Datenpunkte der Proben im über *PC1* und *PC2* neu gebildeten Datenraum von der Lagervariante bei 0°C bis hin zur Raumtemperatur (Abb. 4.2.17).

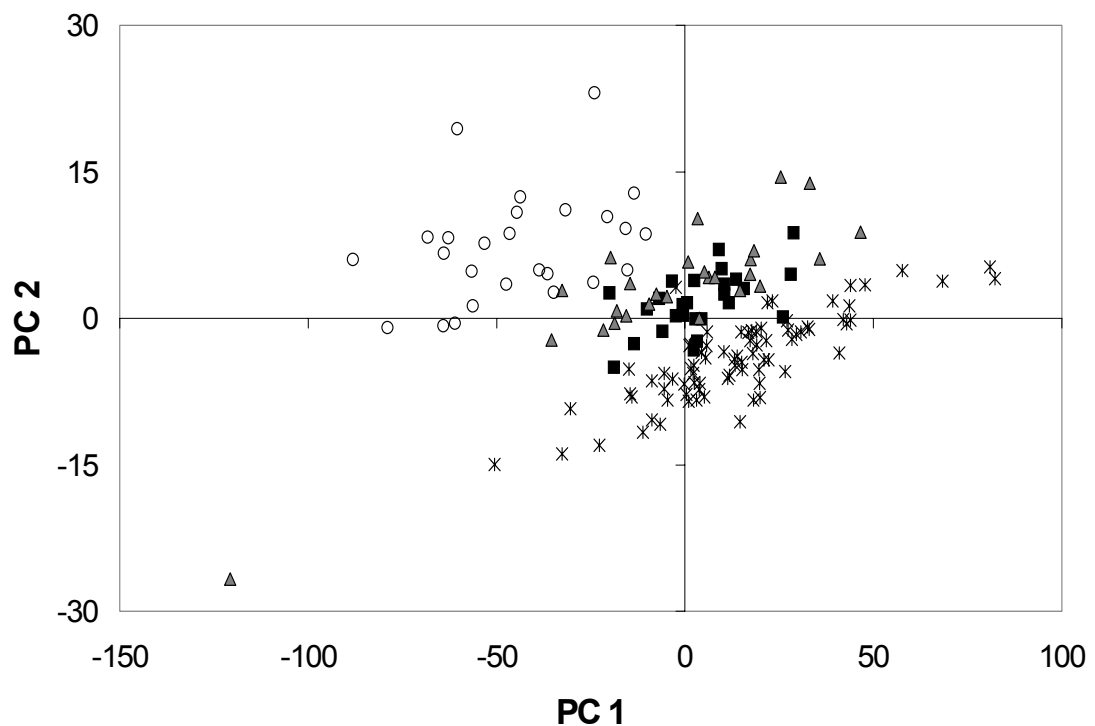


Abb. 4.2.17: *Scores* nach MZ_P der Rohdaten der mit 337 nm angeregten Fluoreszenzspektren von Möhren vor (*) und nach vierwöchiger Lagerung bei 0°C (□), 4°C (▲) und Raumtemperatur (○).

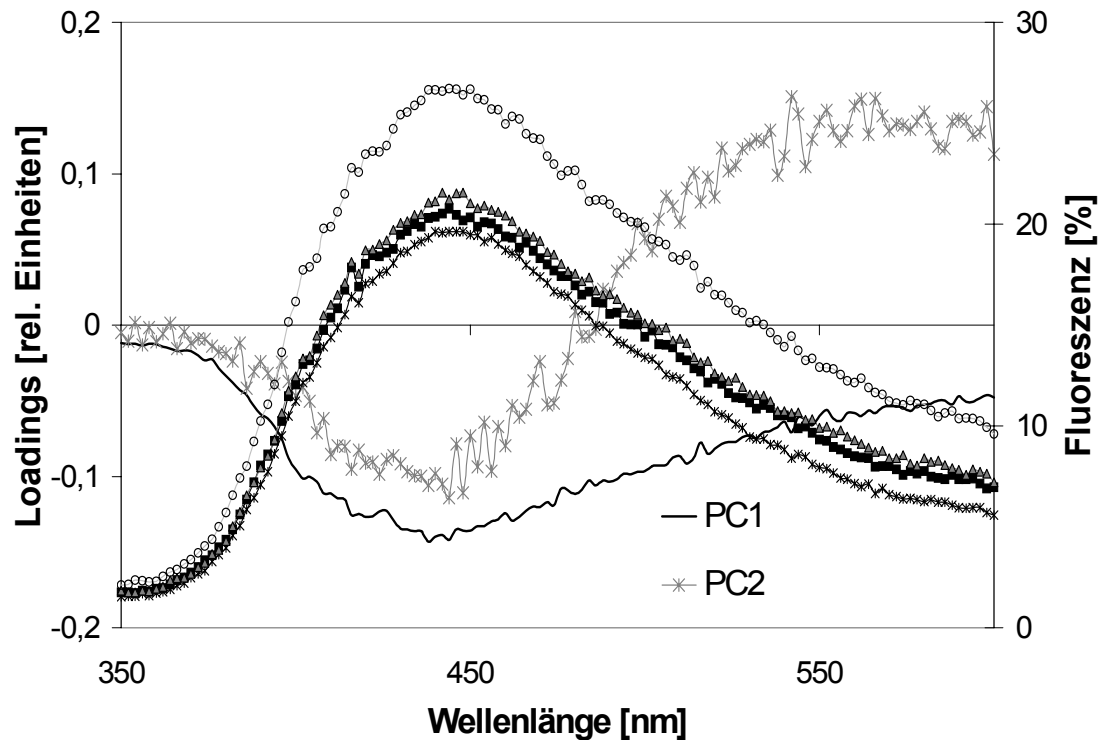


Abb. 4.2.18: *Loadings* der ersten zwei *PC* nach MZ_P der Rohdaten mit 337 nm angeregter Fluoreszenz bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerter Möhren und Mittelwerte der Möhrenfluoreszenzspektren vor (*) und nach vierwöchiger Lagerung bei 0°C (□), 4°C (▲) und Raumtemperatur (○).

Entlang der ersten Hauptkomponente (89,12 % der Gesamtvarianz) wurden die gelagerten Proben in den negativen Achsenabschnitt verschoben. Die Signatur der *Loadings* (Abb. 4.2.18) weist darauf hin, dass diese Veränderung von einer vor allem im blau-grünen Wellenlängenbereich auftretenden Fluoreszenzintensitätszunahme abhängt, die proportional ist zur Steigerung der Temperatur (0°C, 4°C und Raumtemperatur) der verschiedenen Lagervarianten. *PC2* unterteilt vor allem die frischen von den bei Raumtemperatur gelagerten Möhren in den positiven respektive negativen Achsenabschnitt. Die *Loadings* machen deutlich, dass bei der zweiten Hauptkomponente neben dem blau-grünen Wellenlängenbereich, indem vor allem die Carotinoide die Fluoreszenzemission beeinflussen, auch der grün-gelbe Bereich um 550 nm, in dem Riboflavin (Vitamin B2) fluoresziert, von Bedeutung ist.

4.3 Reabsorptions- und Löschungseffekte

4.3.1 Reinstsubstanzen

Die mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie messbaren Veränderungen von Gartenbauprodukten sind vor allem auf die variierende Zusammensetzung von sich gegenseitig beeinflussenden Fruchtinhaltsstoffen zurückzuführen. Neben der zuvor gezeigten Faktorenanalyse zur Identifizierung von Wellenlängenbereichen sollten in der vorliegenden Arbeit auch Möglichkeiten einer quantitativen Analyse von Inhaltsstoffen getestet werden. In den folgenden Versuchen wurden zunächst Wechselwirkungen von Fruchtpolyphenolen und ihr Einfluss auf die spektralen Intensitäten der emittierten Strahlung untersucht. Für Fluoreszenzmessungen an Reinstsubstanzen wurden typische Inhaltsstoffe von Apfel und Erdbeere ausgewählt (Tab. 4.3.1). Mit Hilfe der spektralen Fluoreszenzanalyse konnte den hier untersuchten Catechinen (Catechin, Epicatechin), die beispielhaft für Erdbeeren und Äpfel ausgewählt wurden, eine Fluoreszenzfähigkeit nachgewiesen werden. Auch die hauptsächlich in Apfelfrüchten enthaltenen Hydroxyzimtsäuren (Kaffee-, Chlorogensäure) fluoreszieren.

Tab. 4.3.1 Maximale Fluoreszenzemission von in Äpfeln und Erdbeeren enthaltenen Polyphenolverbindungen und Ascorbinsäure

	Wellenlängenbereiche der Fluoreszenzanregung [nm]	Maximale Fluoreszenzemission [nm]
Catechin	250 - 300	310
Epicatechin	250- 300	311
Kaffeesäure	300 - 400	436
Chlorogensäure	300 - 400	440

Aus der Gruppe der Dihydrochalkone wurde zudem das für den Apfel charakteristische Phloridzin untersucht. Rutin gehört zu der Gruppe der Flavonole und kommt sowohl in Äpfeln als auch in Erdbeeren vor. Bei den zwei letztgenannten wurde im Gegensatz zu den fluoreszierenden Catechinen und Hydroxyzimtsäuren beispielhaft der Einfluss von Substanzen, die keine Autofluoreszenz aufweisen, auf die spektrale Fluoreszenzanalyse geprüft. Hier wird eine Beeinflussung des Fluoreszenzsignals aufgrund der Absorption erwartet, die für Phloridzin im ultravioletten Wellenlängenbereich von 200 nm bis 300 nm mit einer maximalen Absorption bei 280 nm und Rutin im Bereich von 200 nm bis 400 nm mit Maxima bei 205 nm, 260 nm und 355 nm liegt.

Konzentrationslöschung

Die Messung von in Methanol gelösten Phenolstandards unterschiedlicher Konzentrationen entsprach in der Intensität der Fluoreszenz einer Sättigungskurve (Abb. 4.3.1). Nur bei sehr hoher Verdünnung ist der

Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zunahme der Konzentration von Kaffeesäure ($r^2 = 0,9945$), Chlorogensäure ($r^2 = 0,9901$), Epicatechin ($r^2 = 0,9967$) und Catechin ($r^2 = 0,9801$) linear. Aus den Angaben der Literatur lässt sich ableiten, dass der lineare Anstieg bis zu gemessenen 0,05 mg/mL dabei in einem für Erdbeeren und Äpfel relevanten Konzentrationsbereich der Gehaltsangaben dieser phenolischen Verbindungen liegt.

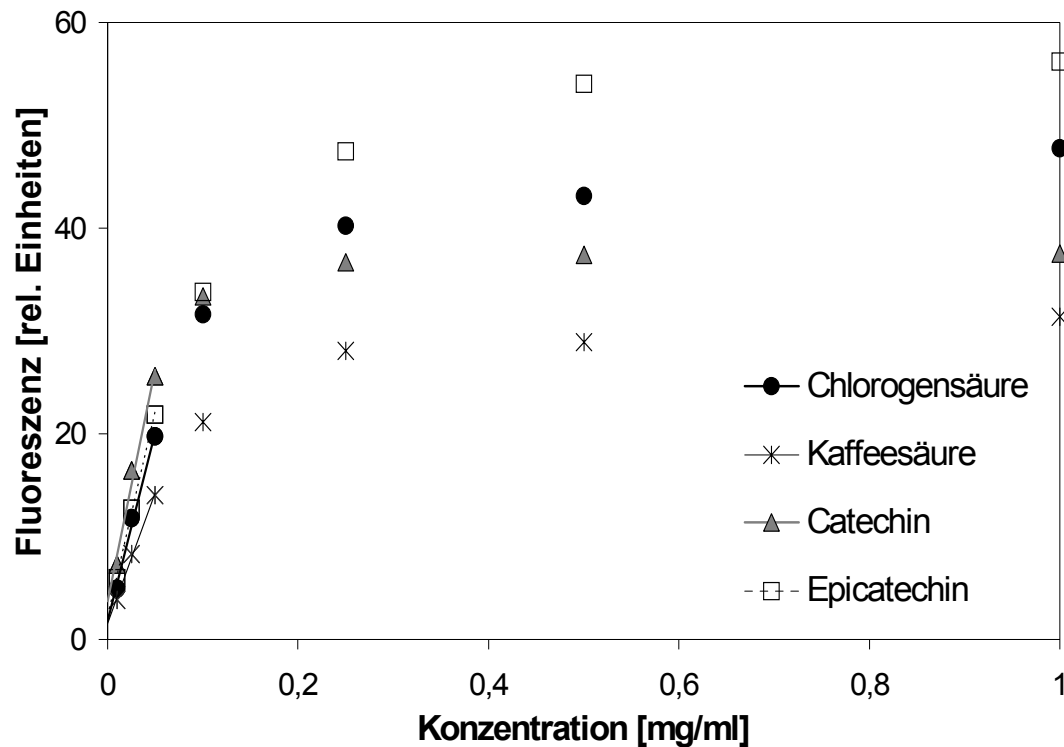


Abb. 4.3.1: Einfluss der Konzentration auf die Intensität der Fluoreszenzemission gemessen bei maximaler Fluoreszenzemission und einer Empfindlichkeit von 400 Volt (Catechine) bzw. 500 Volt (Hydroxymizinsäuren).

Ab einer Konzentration von 0,1 mg/mL ist jedoch für alle in den Ergebnissen dargestellten Reinstsubstanzen eine Sättigung der Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 4.3.1). Diese ist bedingt durch die sogenannte Konzentrationslöschung. Die Beziehung zwischen der Konzentration und der Fluoreszenzintensität in stark verdünnten Lösungen ist durch den Extinktionskoeffizienten (ϵ), die Schichtdicke (d) und die Konzentration (c) gegeben (Gl. 4.3.1).

$$\epsilon * d * c \quad (\text{Gl. 4.3.1})$$

Bei höheren Konzentrationen kommt es zu Selbstabsorption- und weiteren Löschungseffekten, so dass die Intensität zunächst nicht mit erhöhter Konzentration weiter steigt. Bei weiterer Konzentrationserhöhung kann es zur Intensitätsabnahme kommen. Die Konzentration einer fluoreszierenden Lösung hat neben den

Löschungseffekten in der Fluoreszenz auch eine Auswirkung auf die Absorptionsverhältnisse, da mit zunehmendem Gehalt in Lösung eine Abschwächung der Leistung des Anregungslichts eintritt.

Interaktionen von Reinstsubstanzen

In einem Konzentrationsbereich, in dem aufbauend auf den zuvor gezeigten Ergebnissen der Konzentrationslöschung ein linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität angenommen werden kann, wurden verschiedene Konzentrationen an Polyphenolen als Gemisch in Lösung gegeben. In den Fluoreszenzanregungsspektren wurde eine Abnahme der Fluoreszenz von Catechin durch die Zugabe der Hydroxyzimtsäuren hervorgerufen, ohne dass spektrale Intensitätsverschiebungen entlang der Wellenlängen auftraten (Abb. 4.3.2). Zudem lässt sich erkennen, dass die limitierenden Effekte auf die messbare Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Kaffeesäure verstärkt auftreten.

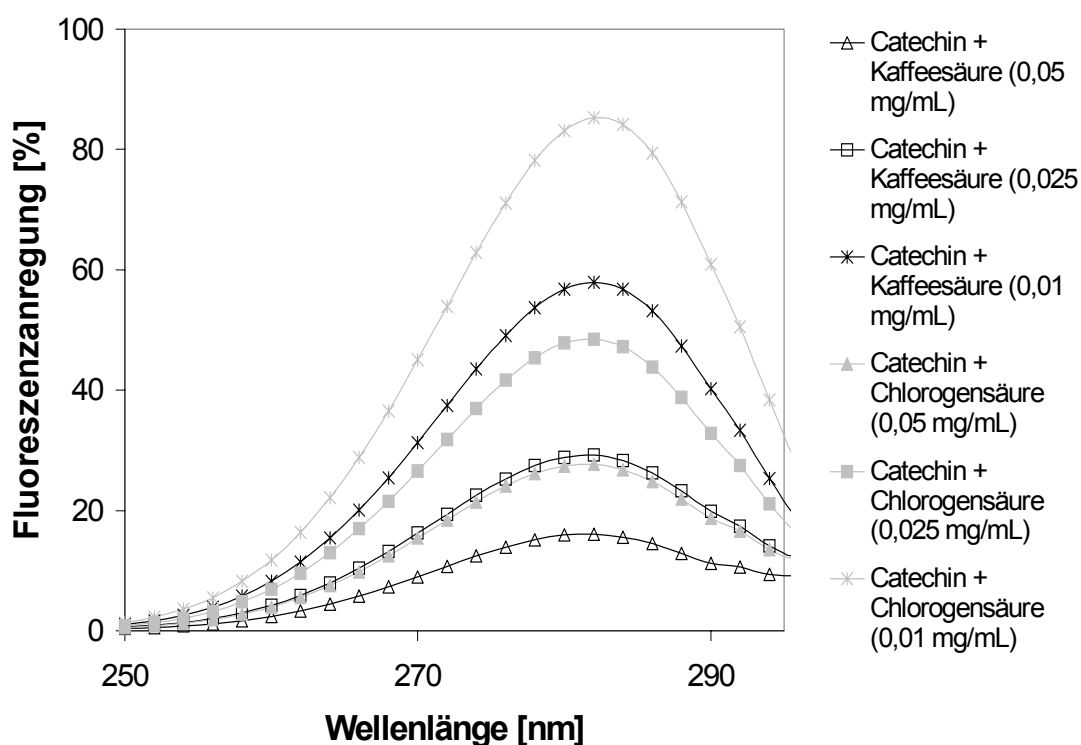


Abb. 4.3.2: Einfluss der Zugabe von Hydroxyzimtsäuren unterschiedlicher Konzentrationen zu 0,05 mg/mL konzentriertem Catechin in Lösung (Methanol) auf die Intensität der Fluoreszenzanregung gemessen bei einer Emissionswellenlänge von 310 nm.

Der stärkere Einfluss von Kaffeesäure im Vergleich zur Chlorogensäure entspricht allerdings nicht den in der Konzentrationsmessung gezeigten Erwartungen. Es ist daher anzunehmen, dass die Kaffeesäure eine geringere Quantenausbeute aufweist. Somit absorbiert sie stärker als die Chlorogensäure, obwohl ihre Fluoreszenzintensität geringer ist. Dieselben Einflüsse wurden in den Emissionsspektren nachgewiesen,

die eine Reduktion der Fluoreszenzintensität von Catechin durch Zugabe von Kaffee- und Chlorogensäure aufzeigen (Abb. 4.3.3).

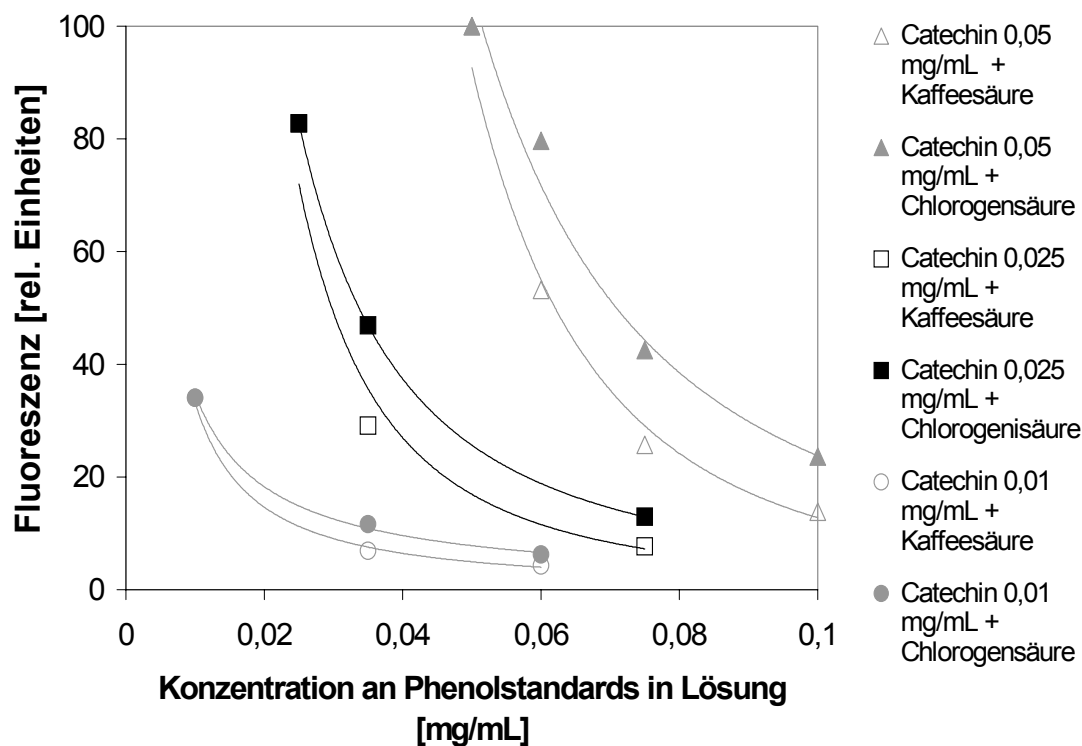


Abb. 4.3.3: Einfluß der Zugabe von Hydroxyzimtsäuren unterschiedlicher Konzentrationen zu Catechin in Lösung (Methanol) auf die Intensität der Fluoreszenzemission gemessen bei der maximalen Intensität bei 310 nm

Tab. 4.3.2: Relative Fluoreszenzintensität der Emission [%] von Catechin (Cat) (gemessen bei 310 nm) mit und ohne Zugabe verschiedener Konzentrationen von Kaffee- (Kaf) bzw. Chlorogensäure (Chl).

	Ohne Zusatz	0,05 mg/mL		0,025 mg/mL		0,01 mg/mL	
		Kaf	Chl	Kaf	Chl	Kaf	Chl
Cat 0,05 mg/mL	100,00	13,87	23,67	25,67	42,57	53,18	79,65
Cat 0,025 mg/mL	82,77	7,73	12,93	-	-	29,12	46,90
Cat 0,01 mg/mL	34,01	4,24	6,30	6,97	11,67	-	-

Wird zu einer Catechin-Lösung der Konzentration 0,05 mg/mL beispielsweise 0,01 mg/mL konzentrierte Kaffeelösung zugegeben, wird die maximale Intensität der Fluoreszenz des Catechins um über 45 % (53,18 %) reduziert (Tab. 4.3.2).

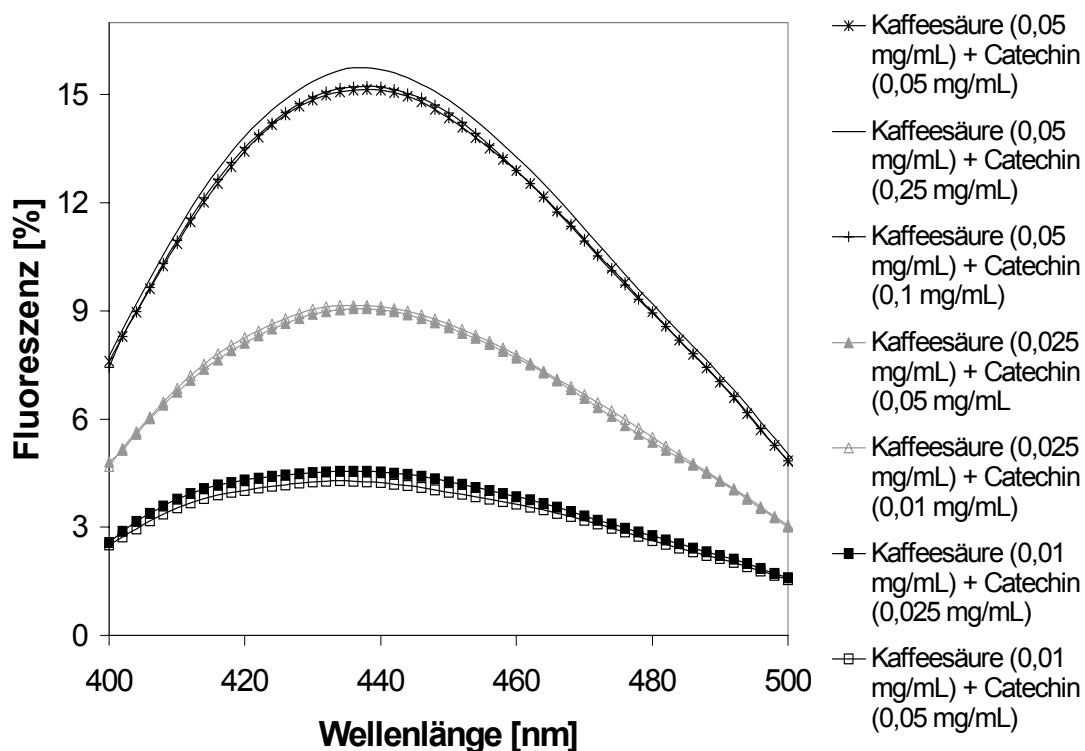


Abb. 4.3.4: Einfluss der Zugabe von Catechin unterschiedlicher Konzentrationen zu Kaffeesäure in Lösung (Methanol) auf die Intensität der Fluoreszenzemission gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm.

Bei Zugabe von Chlorogensäure der gleichen Konzentration beläuft sich die Reduktion hingegen auf nur etwa 20 % (79,65 %). Versuchsreihen mit Epicatechin führten zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht dargestellt). Eine Überlagerung der emittierten Fluoreszenz kann ausgeschlossen werden, da die Hydroxyzimtsäuren (Fluoreszenzintensitätsmaximum bei 440 nm) nicht im selben Wellenlängenbereich wie die Catechine (bei 310 nm) fluoreszieren. Vielmehr ist hier eine Konkurrenz um das vorhandene Anregungslicht anzunehmen, was infolge der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Intensität der Lichtquelle zu einer Reduktion der emittierten Fluoreszenz führt. Dies wird bestätigt durch den im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm nicht vorhandenen Einfluss des Catechins auf die Fluoreszenzintensität der Hydroxyzimtsäuren (Abb. 4.3.4). Letztere werden in einem Wellenlängenbereich um 350 nm angeregt, die Catechine hingegen zwischen 250 nm und 300 nm.

Neben den stark fluoreszierenden Catechinen und Hydroxyzimtsäuren wurde im Folgenden der Einfluss von nichtfluoreszierenden Phenolverbindungen am Beispiel von Phloridzin und Rutin untersucht. Am Beispiel von Chlorogensäure der Konzentration von 0,05 mg/mL ist in Abb. 4.3.5 der Einfluss dieser zwei gemessenen Standards auf die Hydroxyzimtsäuren dargestellt.

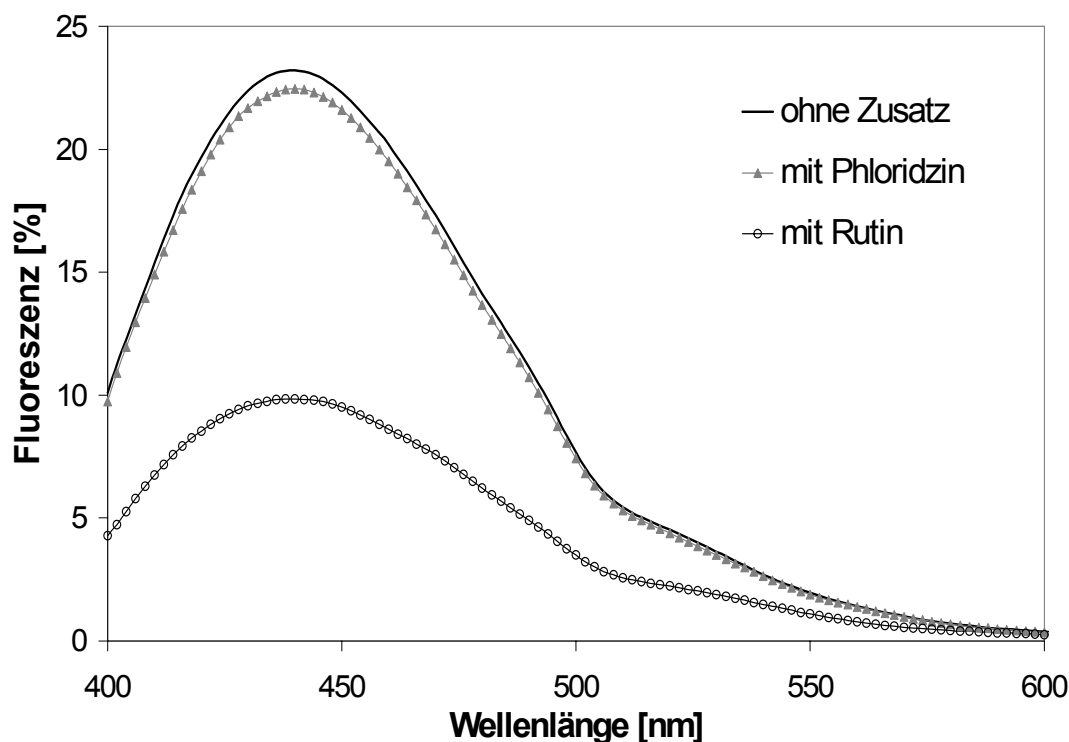


Abb. 4.3.5: Fluoreszenzmissionsspektren von 0,05 mg/mL konzentrierter Chlorogensäure-Lösung mit und ohne Zusatz von 0,05 mg/mL konzentrierter Phloridzin- oder Rutin-Lösung gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm.

Bei einer Zugabe von 0,05 mg/mL konzentrierter Rutin-Lösung wird die Fluoreszenzintensität der Chlorogensäure bei 440 nm um 57,57 % reduziert. Der Einfluss von Phloridzin ist bei einer minimalen Reduktion um 3,21 % der Fluoreszenzintensität ebenfalls zu vernachlässigen. Ähnliche Ergebnisse der Fluoreszenzintensitätsreduktion wurden für Kaffeesäure bei Zugabe von Phloridzin (0,11 %) und Rutin (60,76 %) im Vergleich zur Lösung ohne Zusatz bei einer Wellenlänge von 436 nm gefunden.

Auf die Fluoreszenz der Catechine hat Phloridzin, genauso wie Rutin, hingegen einen erheblichen Einfluss (Daten nicht dargestellt). Während durch Zugabe von Rutin (0,05 mg/mL) bei beiden Catechinen eine ähnlich starke Intensitätsreduktion um 60 % stattfindet, hat Phloridzin hier einen verstärkten Effekt. Wird der Epicatechin- bzw. Catechin-Lösung 0,05 mg/mL konzentrierte Lösung des Dihydrochalkones zugesetzt, wird die Intensität des Fluoreszenzsignals um 75 % vermindert. Bei Zugabe von nicht-fluoreszierendem Phloridzin stellt die Absorption eine Quelle für die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten der Phenole dar. Die Phloretin-Glykoside absorbieren bei ca. 284 nm, so dass ein emissionsvermindernder Effekt speziell bei den Catechinen, nicht aber bei den Hydroxyzimtsäuren auftritt. Im Gegensatz dazu erstreckt sich das Absorptionsspektrum des Rutins von 200 nm bis 400 nm mit einem Maximum bei 354 nm, so dass die Fluoreszenzintensität beider Phenolgruppen reduziert wird. Dieses

Maximum der Quercetin-Glykoside ist der Grund dafür, weshalb Phloridzin mit einer ausgeprägteren Absorption bei 280 nm eine Verminderung der Fluoreszenzintensität der Catechine bewirkt.

4.3.2 Apfelextrakte

Im folgenden Versuch wurde die Zugabe von Phenolstandards auf das Fluoreszenzverhalten von Fruchthaltstoffen in polaren Extrakten von Äpfeln getestet, in denen die Fruchtpolyphenole erwartet werden können. Den mit Hilfe von Methanol aus den Früchten extrahierten phenolischen Verbindungen wurde je 0,05 mg/mL konzentrierte Kaffeesäure- bzw. Chlorogensäure-Lösung beigelegt. In den Fluoreszenzspektren konnte ein intensitätsmindernder Einfluss beider Hydroxyzimtsäuren auf die Fluoreszenzemission der Apfelextrakte in einem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 350 nm nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Entsprechend den Ergebnissen an den Phenolstandards reduziert die Kaffeesäure die Intensität der Fluoreszenzemission im Vergleich zum Extrakt ohne Zusatz (77,97 % Reduktion) in diesem Bereich ebenfalls stärker als die Chlorogensäure (71,93 %).

Weiterhin wurden den Apfelextrakten je 0,05 mg/mL konzentrierte Lösung von Phloridzin und Rutin beigelegt. Beispielhaft ist der Datensatz der Fluoreszenzemissionen bei einer Anregung von 364 nm für die Hydroxyzimtsäuren (Abb. 4.3.6) dargestellt. Bei der maximalen Emissionswellenlänge der Catechine wird die emittierte Fluoreszenzintensität in geringem Maße um 10,08 % reduziert (Daten nicht dargestellt). Hingegen kommt es zu einer Intensitätsverringerung durch Rutin (52,48 %) und Phloridzin (65,61 %) in diesem Bereich. Im blau-grünen Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm wird das Integral der Fluoreszenzintensität durch die Zugabe des Dihydrochalkons nicht beeinflusst (Tab. 4.3.3), durch das Flavonol allerdings um 34,54 % im Vergleich zur Fluoreszenzemission der reinen Apfelextrakte reduziert. Im für das Chlorophyll charakteristischen Bereich von 650 nm bis 700 nm führt die Präsenz von 0,05 mg/mL konzentrierter Rutin-Lösung sogar zu einer Reduktion der integrierten Intensität um 58,35 %. Rutin wirkt durch seinen *UV*-Filtereffekt bedingt durch die breite Absorptionsbande von 200 nm bis 400 nm auch im blau-grünen Wellenlängenbereich intensitätsmindernd.

Tab. 4.3.3: Integrale der Fluoreszenzintensität [%] der polaren Apfelextrakte im blau-grünen (400-500 nm) und roten (650-700 nm) Wellenlängenbereich mit und ohne Zugabe von Phloridzin bzw. Rutin.

	400 – 500 nm	650 – 700 nm
ohne Zusatz	100,00	100,00
mit Phloridzin	105,03	105,21
mit Rutin	65,46	41,65

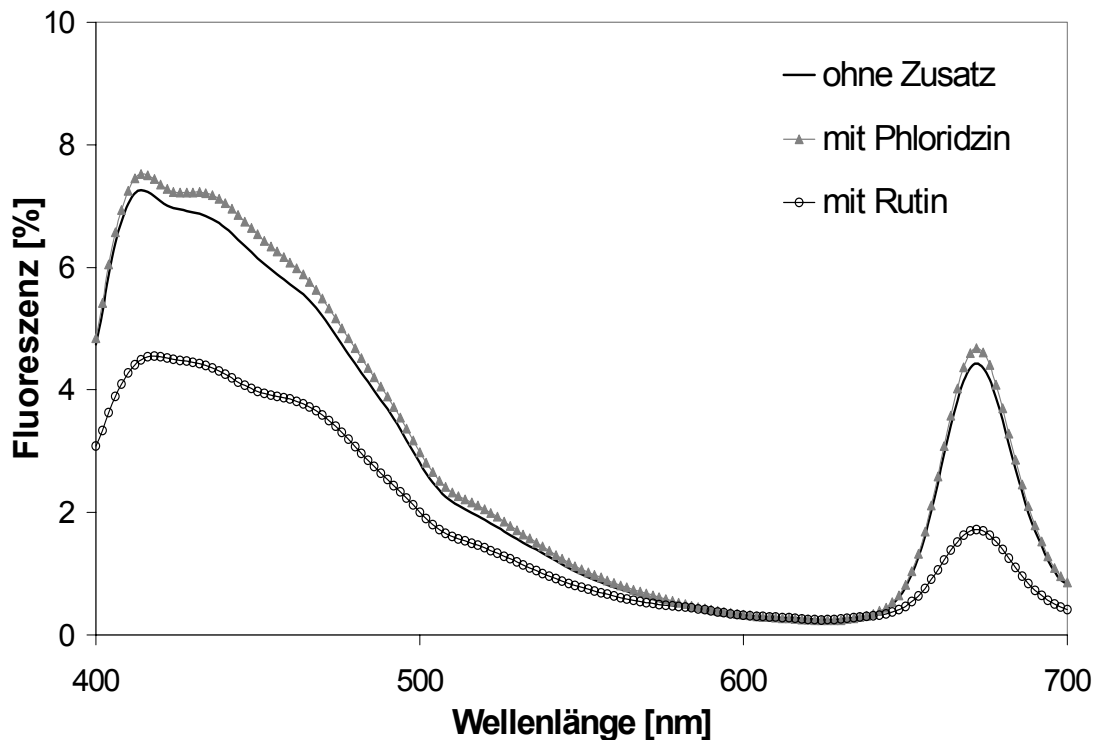


Abb. 4.3.6: Fluoreszenzemission (angeregt bei 364 nm) von polaren Apfelextrakten mit und ohne Zusatz von 0,05 mg/mL konzentrierter Phloridzin- bzw. Rutin-Lösung.

Zurückführen lassen sich diese Effekte vorrangig auf die Absorptionseigenschaften der zugegebenen Reinstsubstanzen. Da in der zerstörungsfreien Messung genau diese Zusammensetzung nicht bekannt ist, kann zum derzeitigen Stand der Technik ausschließlich ein multivariates Anlernverfahren für eine Kalibrierung auf spezifische Inhaltsstoffe genutzt werden.

4.3.3 Analyse am Produkt: Verbräunungsreaktionen

Im Verarbeitungsprozess kommt es zu mechanischer Belastung (z.B. durch Schneiden oder Druck) auf die Früchte, die zu erhöhtem Sauerstoffpartialdruck sowie veränderten Enzymaktivitäten und folgender Verbräunungsreaktion des Fruchtgewebes führen. Die spektrale Fluoreszenzanalyse wird durch diese Stoffwechselreaktionen im lebenden Produkt stark beeinflusst. Versuchsreihen wurden zur Abschätzung eines möglichen Einflusses der Verbräunung auf das Fluoreszenzsignal an frisch geschnittenen Äpfeln durchgeführt. Hierbei wurden an den Apfelstücken im Verlauf einer Stunde wiederholt gemessen. Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Fluoreszenzintensität über das gesamte Spektrum von 400 nm bis 700 nm (Abb. 4.3.7). Dabei erscheint die Intensitätsverringerung im blau-grünen Wellenlängenbereich stärker ausgeprägt als im roten, in dem um 680 nm nur geringe Veränderungen im Verlauf der Messungen stattfanden.

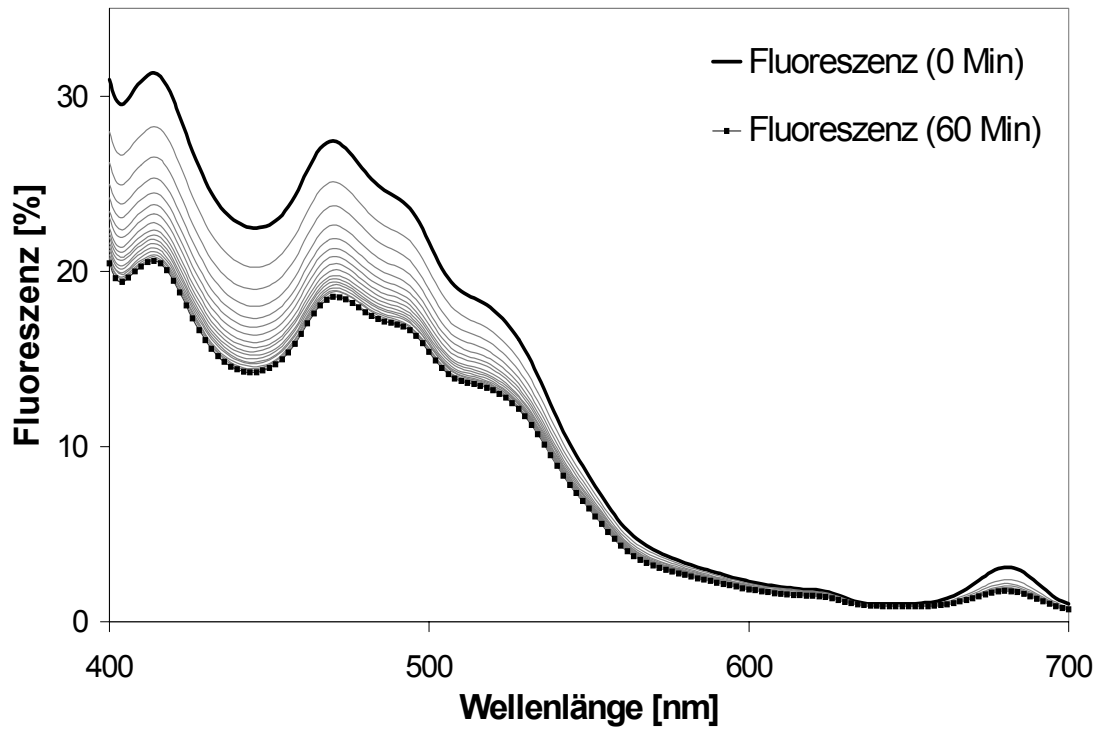


Abb. 4.3.7: Fluoreszenzspektren gemessen am Apfelfruchtfleisch direkt nach dem Schneiden (0 Minuten) und im Verlauf einer Stunde (60 Minuten).

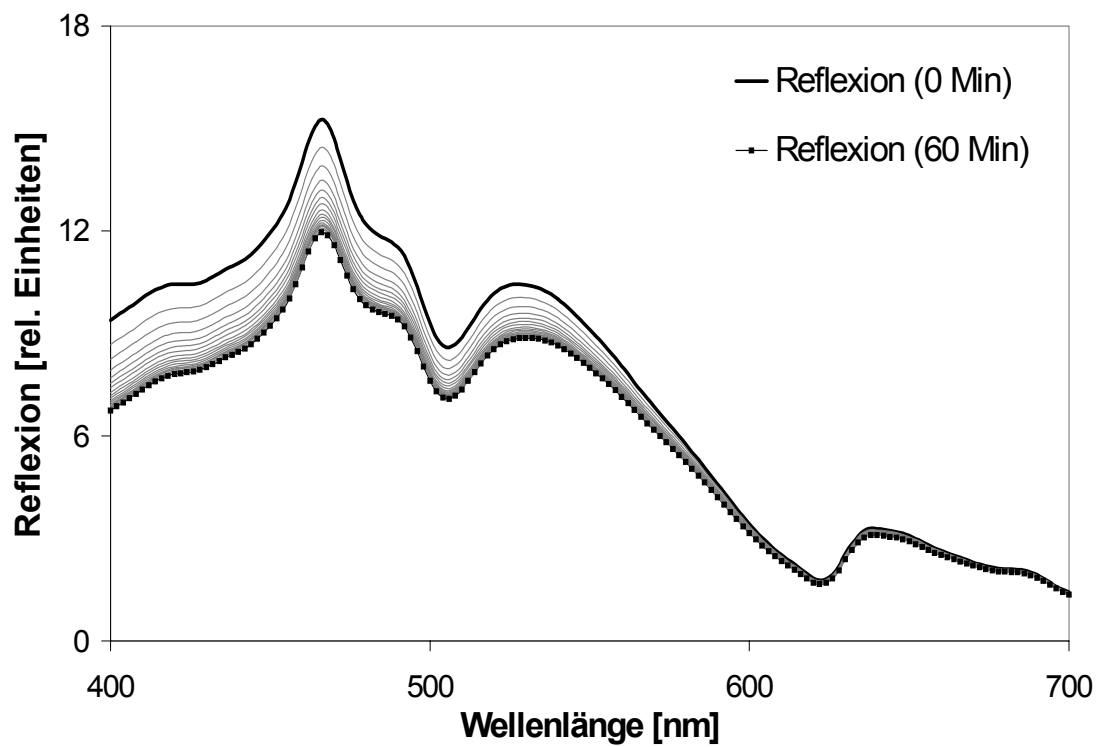


Abb. 4.3.8: Reflexionsspektren gemessen am Apfelfruchtfleisch direkt nach dem Schneiden (0 Minuten) und im Verlauf einer Stunde (60 Minuten).

Diese Reduktion geht mit einer sichtbaren Verbräunung des Fruchtfleisches einher. Die gleichzeitig gemessenen Reflexionsspektren führen ebenfalls zu einer Intensitätsverminderung in dem Bereich von 400 nm bis 600 nm (Abb. 4.3.8). Im roten Wellenlängenbereich sind die Veränderungen der Reflexion im Verlauf einer Stunde nach dem Schneiden hingegen nur minimal.

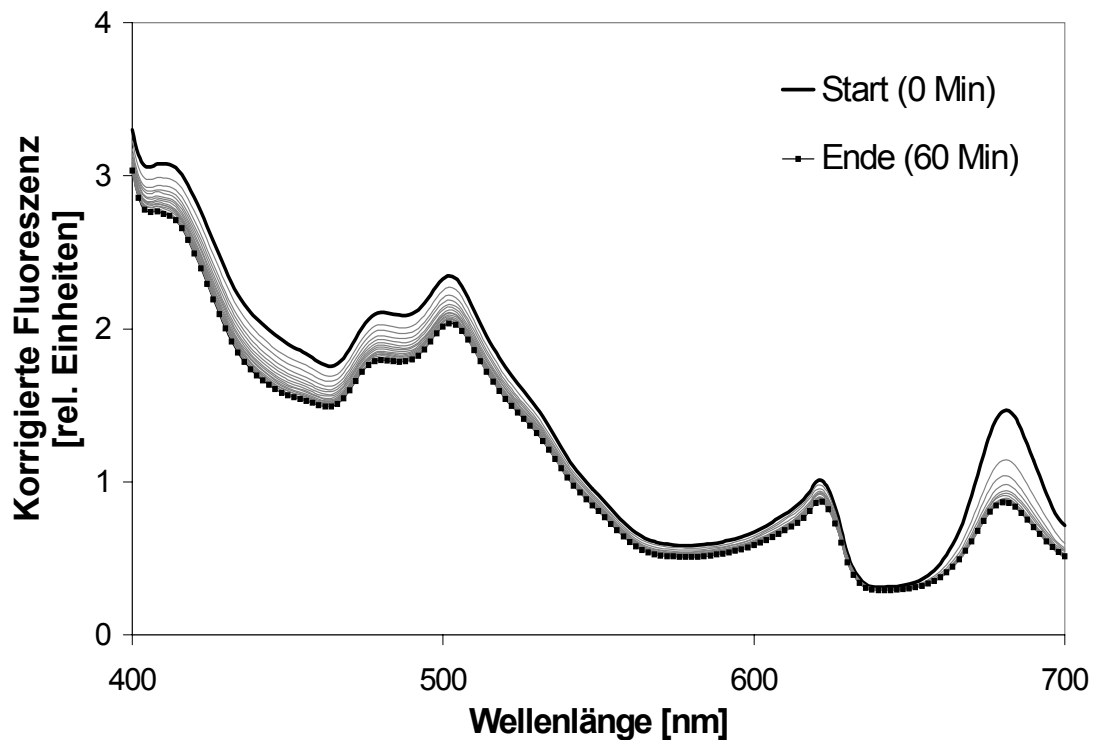


Abb. 4.3.9: Mit Hilfe der Reflexionsspektren korrigierte Fluoreszenzemissionsspektren (Emission/Reflexion) gemessen am Apfelfruchtfleisch direkt nach dem Schneiden (0 Minuten) und im Verlauf einer Stunde (60 Minuten).

Infolgedessen wurde die relative Veränderung (Fluoreszenz/Reflexion) der Reflexion in der Fluoreszenz über den zeitlichen Verlauf der Messungen, betrachtet, um durch die Verbräunung bedingte Reabsorptionseffekte zu eliminieren. Die somit korrigierte Fluoreszenz zeigt eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität im roten Wellenlängenbereich, in dem die Chlorophylle fluoreszieren, während die Abweichungen im blau-grünen geringer ausfallen (Abb. 4.3.9).

Die Integrale der Reflexionsspektren zeigen einen nicht-linearen Verlauf der Verbräunungsreaktion (Daten nicht dargestellt). In den ersten 10 Minuten finden 9,25 % dieser Veränderung statt, während in den folgenden 50 Minuten mit einer Reduktion um weitere 8,03 % lediglich sehr langsame Reaktionen an der Oberfläche zu messen sind.

Die korrigierten Fluoreszenzspektren zeigen, dass im Verlauf einer Stunde die Fläche der Fluoreszenzintensität über das gesamte Spektrum um ca. 15 % reduziert wird (Tab. 4.3.4). Bei einer wellenlängenspezifischen Auswertung wird im blau-grünen Bereich eine Veränderung von 13,52 % und im grün-orangen von 12,5 % im Vergleich zur deutlich höheren (33,72 %) Reduktion des Integrals der Fluoreszenzintensität im roten Wellenlängenbereich deutlich.

Tab. 4.3.4: Integrale der korrigierten Fluoreszenzspektren der Verbräunungsmessung am Apfelfruchtgewebe.

	Fläche Gesamtspektrum		Fläche 400-550 nm		Fläche 550-650 nm		Fläche 650-700 nm	
	r.E.	%	r.E.	%	r.E.	%	r.E.	%
Emission								
Start	1900,49	100	1711,00	100	139,59	100	49,90	100
60 Min.	1308,13	68,83	1165,50	68,12	110,94	79,48	31,68	63,49
Reflexion								
Start	1109,38	100	832,41	100	218,50	100	58,46	100
60 Min.	917,70	82,72	662,87	79,63	199,05	91,10	55,78	95,41
Korrigierte Emission								
Start	211,78	100	157,29	100	31,41	100	23,09	100
60 Min.	178,80	84,43	136,02	86,48	27,48	87,50	15,30	66,28

Die hier vor allem im blau-grünen Wellenlängenbereich auftretenden Reflexionseffekte bestimmen somit die Intensität der emittierten Fluoreszenz stärker als die effektive Veränderung, die möglicherweise durch Gehaltsveränderungen der fluoreszierenden Fruchtinhaltsstoffe bedingt ist.

Um mit der Fluoreszenzanalyse den Gehalt einzelner Fruchtinhaltsstoffe erfassen zu können, müssen Reabsorptions- und Löschungseffekte aller sowohl fluoreszierender als auch nicht-fluoreszierender Moleküle bewertet, und sich überlagernde Fluoreszenzsignale voneinander getrennt werden können. Wie schon im vorherigen Absatz dargestellt, könnte eine Fluoreszenzanalyse an der komplexen pflanzlichen Matrix am ehesten auf der Basis multivariater Methoden durchgeführt werden. Hierbei können die vielfältigen Interaktionen der Inhaltsstoffe mit Hilfe von Betrachtungen der auftretenden Varianzen in den Fluoreszenzspektren ausgewertet werden.

4.4 Vorverarbeitung und Kalibrierung

Im ersten Versuchsansatz zur zerstörungsfreien Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie konnten qualitative Veränderungen von Gartenbauprodukten im Nachernteprozess nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Wechselwirkungen von Fruchthaltstoffen mittels verschiedener Standards auf die Fluoreszenz-emission analysiert, wobei die Komplexität von Reabsorptions-, Lösungs- und Überlagerungseffekten im lebenden Produkt deutlich wurde. In einem nächsten Schritt sollen auf der Basis von chromatographisch ermittelten Referenzdaten und dem Fluoreszenzsignal mit multivariaten Auswertungsverfahren Kalibriermodelle zur zerstörungsfreien Analyse wertgebender Inhaltsstoffe entwickelt werden. Vorrangiges Ziel war es hierfür geeignete Signal- und Datenvorverarbeitungsmethoden zu erproben, um das Fluoreszenzsignal des Fruchtgewebes für die quantitative Kalibrierung zu nutzen. Als Versuchsmaterial ausgewählt wurden die zu verschiedenen Saisons verfügbaren und wirtschaftlich bedeutenden Kulturen: *Malus x domestica* und *Fragaria x ananassa*.

4.4.1 Signalvorverarbeitungsmethoden

Apfel- und Erdbeerfrüchte weisen einen hohen Anteil phenolischer Verbindungen mit unterschiedlichem Profil auf. Mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden die Gehalte an einzelnen Polyphenolen in den polaren Extrakten der Früchte ermittelt. Zur Identifizierung wurden die spezifischen Absorptionsspektren und Retentionszeiten verglichen. Dazu wurden Vergleichsmessungen an Phenolstandards durchgeführt. Ergänzend wurden an den Erdbeerproben Co-Chromatographien durchgeführt, um die Zuordnung der Polyphenole zu den Maxima in den Chromatogrammen zu überprüfen. Die Fruchtpolyphenolgehalte wurden mit Hilfe von an Standards ermittelten Kalibrierkurven bestimmt.

Mit Hilfe der *partial least squares* (PLS) Regressionsanalyse wurde ein Kalibriermodell auf den zerstörungsfrei ermittelten Fluoreszenzspektren, die in der folgend verwendeten *X*-Matrix zusammengefasst wurden, und dem chromatographisch bestimmten Phenolgehalt (*y*-Vektor) aufgebaut. Es wurden verschiedene Signal- und Datenvorverarbeitungsmethoden für die *X*-Matrix miteinander verglichen, während der *y*-Vektor generell autoskaliert wurde. Die Glättung und die Derivatbildung der *X*-Matrix wurden auf Grundlage des Savitzky-Golay-Algorithmus über ein Intervall mit sieben Stützpunkten mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung errechnet. Die Berechnung der PLS Regression erfolgte mit dem SIMPLS-Algorithmus und die Kreuzvalidierung wurde auf zusammenhängenden Blöcken ($n = 7$) durchgeführt. Im Folgenden wurden die Kalibriermodelle am Beispiel von Apfel und Erdbeere parallel betrachtet.

Für den Apfel-Datensatz ($n = 50$) wurde die Kalibrierung für den Gehalt einer Hydroxyzimtsäure erarbeitet. Die eindeutige Zuordnung zur Chlorogensäure oder Kaffeesäure war mittels der spezifischen Absorptionsspektren und Retentionszeiten nicht möglich, so dass dieses Phenol im Folgenden als Derivat der Hydroxyzimtsäure bezeichnet wurde. Die Probenanzahl wurde reduziert ($n = 43$), da das Hydroxyzimtsäurederivat nicht in allen Proben nachgewiesen werden konnte. Die Auswahl der optimalen Anzahl la-

tenter Variablen (LV) mit Hilfe der Kreuzvalidierung ergab zumeist den geringsten Fehler ($rmsecv$) bei Verwendung einer LV . Lediglich bei der auf autoskalierten Fluoreszenzspektren erarbeiteten Kalibrierung wurden die geringsten Fehler in der Kreuzvalidierung mit zwei LV gefunden (Tab. 4.4.1).

Tab. 4.4.1 Bestimmtheitsmaß (r_c^2), Kalibrierfehler ($rmsec$) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler ($rmsecv$) der mit Hilfe von *partial least squares* (PLS) Regressionsanalyse mit zwei latenten Variablen ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats in Äpfeln.

Signalvorverarbeitung	r_c^2	$rmsec$ [%]	$rmsecv$ [%]
Rohdaten	0,481	25,57	37,59
Glättung	0,110	33,13	35,75
1. Ableitung	0,134	32,47	34,92
2. Ableitung	0,158	31,90	39,86
Mittelwertzentrierung	0,407	26,68	39,74
Autoskalierung	0,401	26,84	33,00

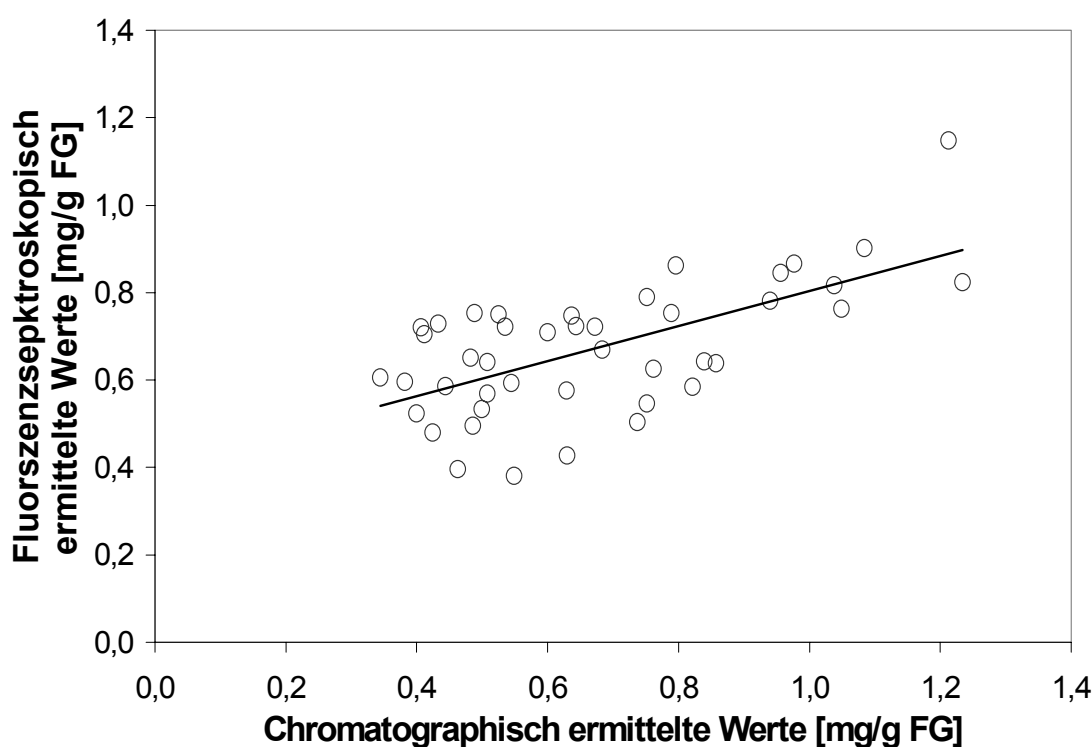


Abb. 4.4.1: Kalibrierung auf mittels Autoskalierung über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Apfel fluoreszenzspektren und des Gehalts des Hydroxyzimtsäurederivat [mg/g Frischgewicht]. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,40$ und $b = 0,40$; $r_c^2 = 0,401$.

Da mit einer latenten Variablen jedoch der überwiegende Anteil der Varianz im Phenolgehalt nicht erfasst werden konnte, wurden jeweils zwei *LV* ausgewählt. Der geringste Fehler in der Kreuzvalidierung konnte für das Modell bestimmt werden, dessen Spektren zuvor über die Proben autoskaliert ($AUTO_P$) wurden. Die Bestimmtheitsmaße (r_c^2) von Kalibriermodellen der Rohdaten und der Daten nach Mittelwertzentrierung (MZ_P) zeigten zwar erhöhte Werte ($r_c^2 = 0,481$ bzw. $r_c^2 = 0,407$) im Vergleich zum Modell nach $AUTO_P$ ($r_c^2 = 0,401$), gleichzeitig nahm jedoch auch ihr $rmsecv$ -Wert zu. In der Abb. 4.4.1 ist das Kalibriermodell nach $AUTO_P$ dargestellt.

Für die Analyse der Erdbeeren ($n = 32$) wurde die Kalibrierung auf dem Gehalt einer als p-Cumaroyl-Glucose identifizierten Hydroxyzimtsäure aufgebaut und dieselben Signalvorverarbeitungsmethoden für die Fluoreszenzspektren getestet. Analog zu den Ergebnissen an Äpfeln wurde für das Kalibriermodell auf den Erdbeerfluoreszenzspektren jeweils zwei latente Variablen nach Maßgabe der Fehler in der Kreuzvalidierung und abgedeckte Varianz im Phenolgehalt ausgewählt (Abb. 4.4.2). Nach MZ_P wurde ein erhöhtes Bestimmtheitsmaß ($r_c^2 = 0,658$) mit einem hohen Fehler in der Kreuzvalidierung ($rmsecv = 103,24\%$) gefunden. Das Modell, das auf den autoskalierten Daten erarbeitet wurde, führte zu einem niedrigeren Bestimmtheitsmaß ($r_c^2 = 0,503$) und einem geringeren Fehler ($rmsecv = 84,14\%$).

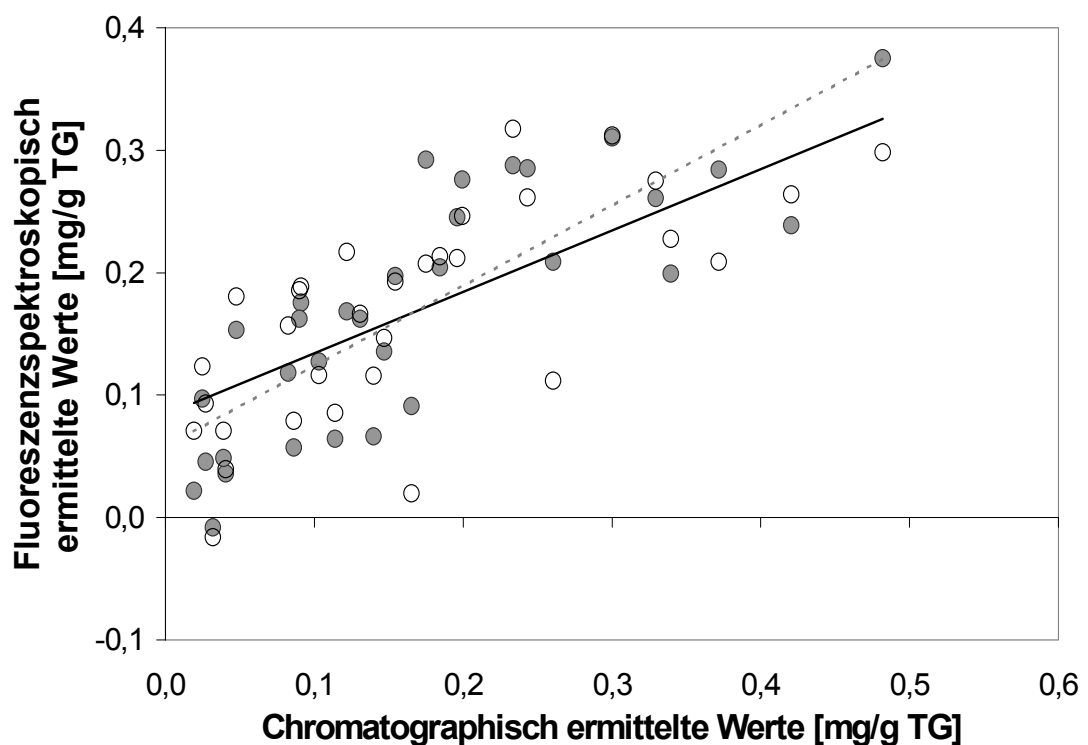


Abb. 4.4.2: Kalibrierung auf mittels Mittelwertzentrierung (grau ---) (Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,66$ und $b = 0,06$; $r_c^2 = 0,658$) und Autoskalierung (weiß —) (Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,50$ und $b = 0,08$; $r_c^2 = 0,503$) über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren und des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose [mg/g Trockengewicht].

Die *Loadings* des an den Apfelfluoreszenzspektren erarbeiteten *PLS*-Modells geben an, welche Wellenlängenbereiche mit welchem Stellenwert für die Berechnung des Kalibriermodells herangezogen wurden (Abb. 4.4.3). Es wird deutlich, dass die Varianz der latenten Variablen sich hauptsächlich auf Veränderungen in den Spektren bezieht, die im roten Wellenlängenbereich bei 680 nm auftreten. Dieser Bereich ist charakteristisch für die Autofluoreszenz des Chlorophylls, so dass keine Kalibrierung auf den tatsächlichen Phenolgehalt sondern eher eine Korrelation von Chlorophyll- und dem Phenolgehalt angenommen werden kann. Da von einem solchen Zusammenhang nicht grundsätzlich ausgegangen werden kann, stellt eine solche Kalibrierung trotz des hohen Bestimmtheitsmaßes kein robustes, praxistaugliches Modell dar.

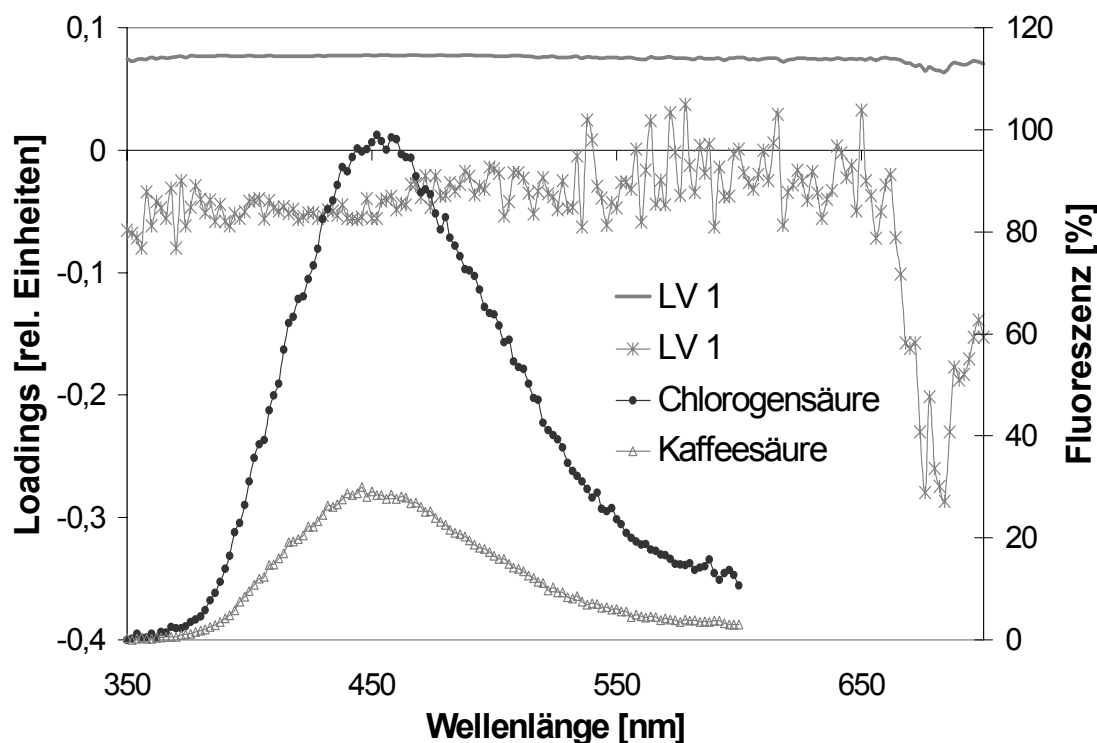


Abb. 4.4.3: *Loadings* der Kalibrierung auf mittels Autoskalierung über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Apfelfluoreszenzspektren und des Gehalts an Hydroxyzimtsäurederivat und Fluoreszenzspektren von in Methanol gelösten Phenolstandards (1 mg/mL).

Als Vergleich sind die Fluoreszenzspektren von Phenolstandardlösungen (Konzentration 1 mg/mL) verschiedener Hydroxyzimtsäuren dargestellt. Chlorogen- und Kaffeesäure fluoreszieren im blau-grünen Wellenlängenbereich.

Bei Erdbeeren zeigen die *Loadings* des *PLS*-Modells auf den Fruchtspektren und dem Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose im Vergleich dazu keine Gewichtung im für die Chlorophylle charakteristischen Wellenlängenbereich (Abb. 4.4.4).

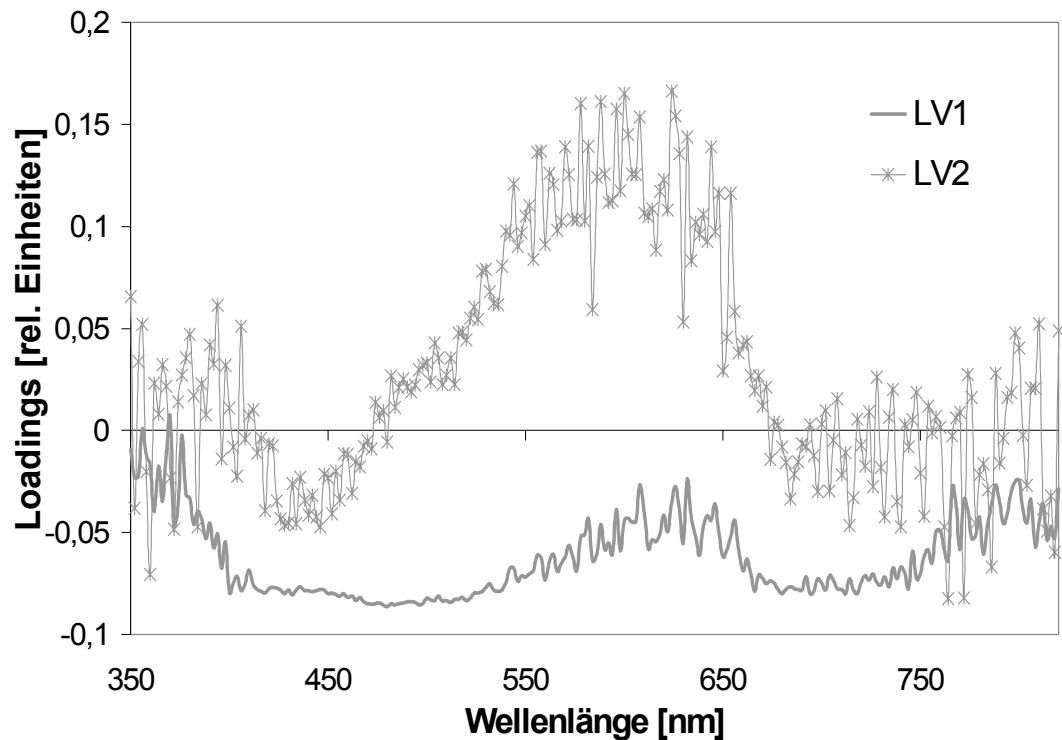


Abb. 4.4.4: *Loadings* der Kalibrierung auf mittels Autoskalierung über die Proben vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren und des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose.

4.4.2 Datenvorverarbeitungsmethoden

Die Kalibrierung auf normierten Spektren führte zu geringen Bestimmtheitsmaßen. Die Signalvorverarbeitungsmethoden werden dabei im Wesentlichen zur Reduktion des Rauschens, zum Ausgleichen von Basislinieneffekten oder zum Angleichen der Wertigkeiten der Variablen eingesetzt. Basierend auf der Annahme, dass die Informationen über den Phenolgehalt nicht in allen Wellenlängen der aufgezeichneten Fluoreszenzspektren gleichermaßen enthalten sind bzw. durch andere Signale überlagert werden können, wurden im Folgenden Methoden der Datenvorverarbeitung getestet.

Um eine Dominanz des im roten Wellenlängenbereich fluoreszierenden Chlorophylls auszuschließen, wurde für die Berechnung der *PLS*-Regression zunächst der spektrale Datensatz auf 350 nm bis 600 nm eingekürzt (Tab. 4.4.2).

Eine weitere Wellenlängenbereichsreduktion auf einen Bereich von 400 nm bis 500 nm erfolgte, um den spezifischen Bereich maximaler Fluoreszenzintensität der Hydroxyzimtsäuren zu nutzen. Beide Reduktionen führten, wiederum bei Verwendung von zwei latenten Variablen, um die Varianz im Phenolgehalt zu erfassen, zu einer erheblichen Verschlechterung des Bestimmtheitsmaßes. Zusätzlich war der Fehler in der Kreuzvalidierung erhöht.

Tab. 4.4.2: Bestimmtheitsmaß (r_c^2), Kalibrierfehler ($rmsec$) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler ($rmsecv$) der mit Hilfe von *partial least squares* (PLS) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle mit zwei latenten Variablen für den Gehalt an Hydroxyzimtsäurederivat in Äpfeln in ausgewählten Wellenlängenbereichen.

Datenvorverarbeitung	r_c^2	$rmsec$ [%]	$rmsecv$ [%]
Gesamter Bereich	0,401	26,84	35,75
350 – 600 nm	0,352	27,88	38,92
400 – 500 nm	0,163	31,71	42,68

Geeigneter Methoden der Wellenlängenselektion stellen die genetischen Algorithmen (*GA*) dar. Mit Hilfe dieser Art der Wellenlängenselektion können speziell einzelne Wellenlängen oder Wellenlängenbereiche, die für die Kalibrierung auf den y -Wert (hier: Phenolgehalt) relevant sind, ausgewählt werden. Für die Datenvorverarbeitung in dieser Arbeit wurde der von RICCARDO LEARDI für *MATLAB* entwickelte Algorithmus verwendet (LEARDI, 2000). Als zusätzliches Kriterium wurde die Signalvorverarbeitung der Rohdaten geprüft, die als Ausgangsmatrix für *GA* dienen.

Durch die Reduktion des Datensatzes der Apfelfluoreszenzspektren auf bestimmte Wellenlängen zeigen die ausgewählten Spektralbereiche nach wie vor keinen direkten Bezug zu den Hydroxyzimtsäurestandards der Chlorogen- und Kaffeesäure, die im blau-grünen Bereich fluoreszieren (Tab. 4.4.3). Die Dominanz des im roten Wellenlängenbereich fluoreszierenden Chlorophylls bleibt auch weiterhin erhalten. Das Bestimmtheitsmaß des Modells konnte um über 10 % gesteigert werden (Abb. 4.4.5).

Tab. 4.4.3: Die mittels genetischer Algorithmen ausgewählten Wellenlängen bzw. Wellenlängenbereiche nach unterschiedlicher Signalvorverarbeitung für die Kalibrierung auf ein Hydroxyzimtsäurederivat bei Äpfeln.

Datenvorverarbeitungsmethode	Wellenlängen [nm]
Rohdaten	442, 600-606
Mittelwertzentrierung	586-590, 600-602, 674-676
Autoskalierung	586-590, 600-602, 674-676

Das Kalibriermodell auf den mittels genetischer Algorithmen ausgewählten Wellenlängen auf den Rohdaten der Apfelfluoreszenzspektren liefert die Ergebnisse mit dem geringsten Bestimmtheitsmaß ($r_c^2 = 0,268$) und erhöhtem Fehler in der Kreuzvalidierung (Tab. 4.4.4). Die Mittelwertzentrierung oder Autoskalierung über die Proben führt mit 26,92 % zu dem geringsten Fehler und dem höchsten Bestimmtheitsmaß ($r_c^2 = 0,528$).

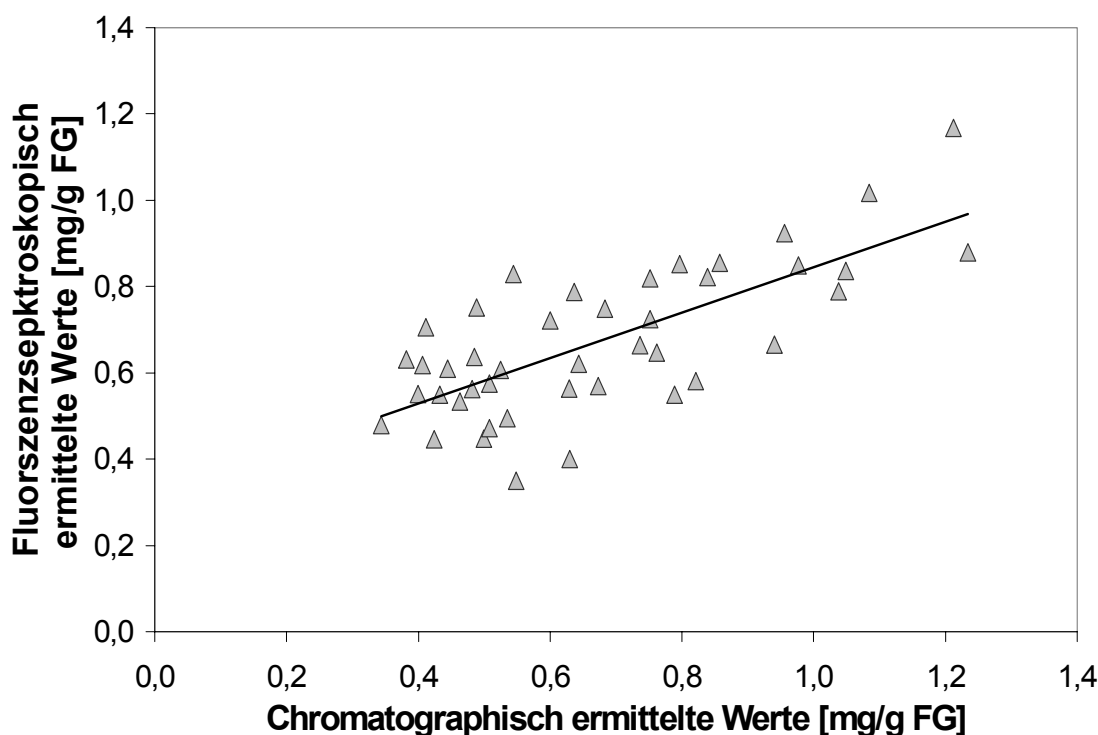


Abb. 4.4.5: Kalibrierung auf mittels Autoskalierung vorverarbeiteten Apfelfluoreszenzspektren und nach Datenvorverarbeitung mit Hilfe genetischer Algorithmen. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 0,53$ und $b = 0,32$; $r_c^2 = 0,528$.

Tab. 4.4.4: Anzahl latenter Variablen (LV), Bestimmtheitsmaß (r_c^2) und Kalibrierfehler ($rmsec$) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler ($rmsecv$) der mit Hilfe von *partial least squares* (PLS) Regressionsanalyse (mit autoskalierter X -Matrix) ermittelten Kalibriermodelle für die Apfelfluoreszenzspektren. Zur Wellenlängenselektion wurden genetische Algorithmen ohne und mit vorheriger Signalvorverarbeitung der Spektren eingesetzt.

Datenvorverarbeitung	LV	r_c^2	$rmsec$ [%]	$rmsecv$ [%]
Rohdaten	4	0,268	29,62	34,07
Mittelwertzentrierung	3	0,528	23,82	26,70
Autoskalierung	3	0,528	23,82	26,70

Die Anwendung des genetischen Algorithmus auf den Erdbeerfluoreszenzspektren und dem Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose führte zu einer Wellenlängenselektion hauptsächlich in den Bereichen von 400 nm bis 550 nm und 580 nm bis 620 nm, abhängig von der Signalvorverarbeitungsmethode (Tab. 4.4.5). Die mit Hilfe von *GA* ausgewählten Spektralbereiche zeigen somit bereits einen Bezug zu den im blau-grünen

Wellenlängenbereich fluoreszierenden Hydroxyzimtsäure-Standards. Eine Dominanz des Chlorophylls, das bei 680 nm fluoresziert, wurde hier nicht festgestellt.

Tab. 4.4.5: Die mittels genetischer Algorithmen ausgewählten Wellenlängenbereiche nach unterschiedlicher Signalvorverarbeitung für die Kalibrierung auf die p-Cumaroyl-Glucose bei Erdbeeren.

Datenvorverarbeitungsmethode	Wellenlängen [nm]
Rohdaten	418-422, 512, 556-560, 580, 620-622
Mittelwertzentrierung	386-388
Autoskalierung	622

Aufgrund der ausgewählten Wellenlängenbereiche, die nicht mit den Bereichen maximaler Fluoreszenzintensität der jeweiligen Phenolstandards übereinstimmen, kann bei der Verwendung von genetischen Algorithmen als Datenvorverarbeitungsmethode nicht von einer robusten Kalibrierung ausgegangen werden. Im Folgenden wurde daher die von WESTERHUIS et al. (2001) für *MATLAB* entwickelte Methode der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) erprobt, um die Varianz aus der spektralen Datenmatrix zu entfernen, die keine Relevanz für die Kalibrierung auf den Phenolgehalt hat. Basierend auf in der Literatur erläuterten Erfahrungen wurden dabei maximal zwei *DOSC*-Faktoren aus der spektralen Datenmatrix entfernt und für die Vorraussetzung der Orthogonalität eine Toleranz von 0,001 eingehalten (WESTERHUIS et al., 2001). Erste Anzeichen, dass mit Hilfe dieser Methode relevante Informationen aus den Spektren extrahiert bzw. nicht relevante oder sogar störende Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzsignal eliminiert werden können, wurden in Messreihen an Apfel und Erdbeere gefunden.

Unterschiede im Fruchthanthocyangehalt dominierten in den verwendeten Versuchsreihen bei Apfel den Einfluss auf das Messsignal, während keine Variationen im Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats vorlagen (Tab. 4.4.6). Führt man eine Hauptkomponentenanalyse mit den Apfelfluoreszenzspektren durch, zeigt sich eine Trennung der grünen und der roten Seite der Frucht entlang der ersten Hauptkomponente (*PCI*), die 98,77 % der Gesamtvarianz beinhaltet (Abb. 4.4.6). Dies ist auf die deutlichen Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten, von auf der Schattenseite (grün) gemessenen Apfelspektren im Vergleich zu den geringeren Intensitäten auf der Sonnenseite (rot) zurückzuführen (Abb. 4.4.7).

Tab. 4.4.6: Statistische Angaben zum Gehalt an Hydroxyzimtsäure [mg/g Frischgewicht] gemessen auf der Sonnen- und der Schattenseite der Äpfel.

Hydroxyzimtsäurederivat [mg/g FG]	Sonnenseite (rot)	Schattenseite (grün)
Mittelwert	0,67	0,68
Standardabweichung	0,23	0,24
Minimum	0,34	0,40
Maximum	1,23	1,21

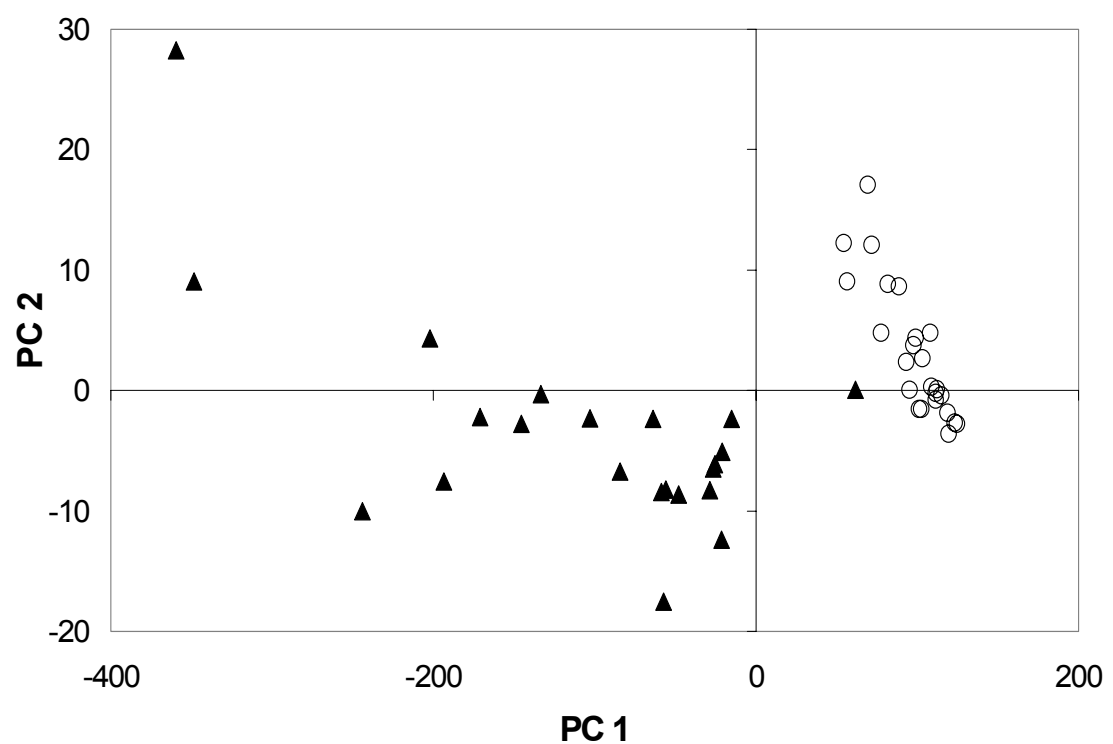


Abb. 4.4.6: PCA der Fluoreszenzspektren gemessenen auf der grünen (▲) und der roten (○) Seite der Äpfel.

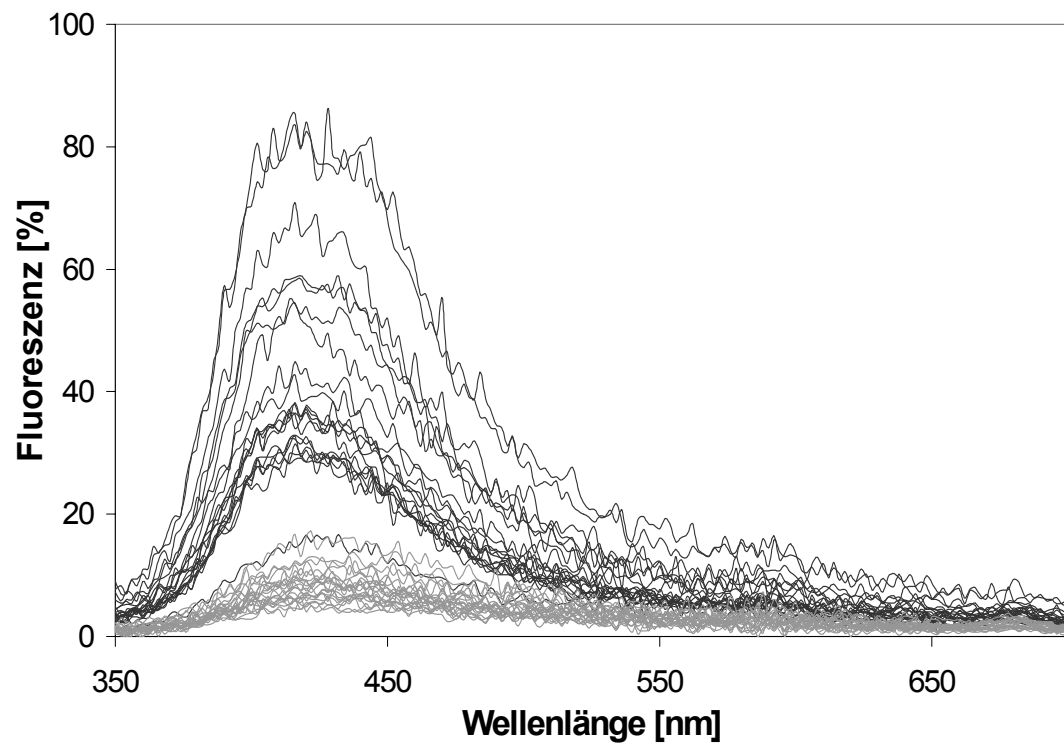


Abb. 4.4.7: Fluoreszenzspektren von der roten (grau) und grünen (schwarz) Seite der Äpfel.

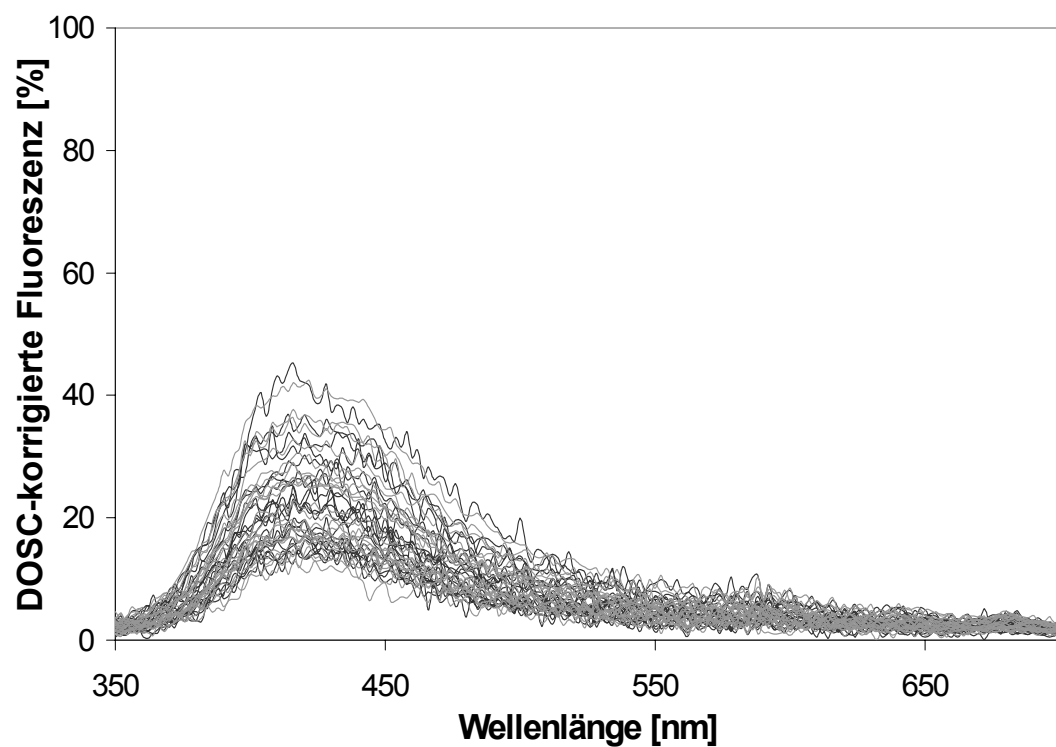


Abb. 4.4.8: Fluoreszenzspektren von der roten (grau) und grünen (schwarz) Seite der Äpfeln nach Entfernung von zwei *DOSC*-Faktoren mit für den Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats nicht relevanten Informationen aus der spektralen Datenmatrix.

In Abb. 4.4.8 sind im Vergleich dazu die Ergebnisse der mittels *DOSC* vorverarbeiteten Apfelfluoreszenzspektren nach Entfernung von zwei Faktoren orthogonaler Information aus der spektralen Datenmatrix bei einer Toleranz von 0,001 dargestellt. Die Fluoreszenzintensitätsunterschiede zwischen der grünen und der roten Fruchtschale wurden als für die Kalibrierung auf den Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats nichtrelevante Information aus dem Datensatz entfernt.

Nach der Datenvorverarbeitung der Apfelfluoreszenzspektren im Hinblick auf den Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats mit Hilfe der direkten orthogonalen Signalkorrektur wurde die neu errechnete Fluoreszenzdatenmatrix nach Entfernung von einem bzw. zwei Faktoren für die Kalibrierung herangezogen. Die *PLS* Regression auf den *DOSC*-vorverarbeiteten Fluoreszenzspektren ohne Signalvorverarbeitung führt sowohl für einen als auch für zwei *DOSC*-Faktoren zu den niedrigsten Bestimmtheitsmaßen und den größten Fehlern in der Kreuzvalidierung (Tab. 4.4.7). Mit Hilfe der Mittelwertzentrierung über die Proben wurden für die Kalibriermodelle jeweils die geringsten Fehler (0,06%) und die höchsten Bestimmtheitsmaße ($r_c^2 = 0,999$) errechnet. In Abb. 4.4.9 ist das Modell, das auf dem mit zwei *DOSC*-Faktoren korrigierten und mittelwertzentrierten spektralen Datensatz gebildet wurde, dargestellt.

Tab. 4.4.7: Anzahl latenter Variablen (*LV*), Bestimmtheitsmaß (r_c^2) und Kalibrierfehler (*rmsec*) bzw. in der Kreuzvalidierung erscheinender Fehler (*rmsecv*) der mit Hilfe von *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse (mit autoskalierter *X*-Matrix) ermittelten Kalibriermodelle für die mit der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) vorverarbeiteten Apfelfluoreszenzspektren.

<i>DOSC</i>-Faktoren	Signalvorverarbeitung der korrigierten Spektren	<i>LV</i>	r_c^2	<i>rmsec</i> [%]	<i>rmsecv</i> [%]
1	Rohdaten	3	0,731	18,15	28,16
	Mittelwertzentrierung	3	0,999	0,02	0,06
	Autoskalierung	3	0,999	0,81	1,94
2	Rohdaten	2	0,601	22,39	32,86
	Mittelwertzentrierung	3	0,999	0,01	0,06
	Autoskalierung	3	0,999	0,68	1,44

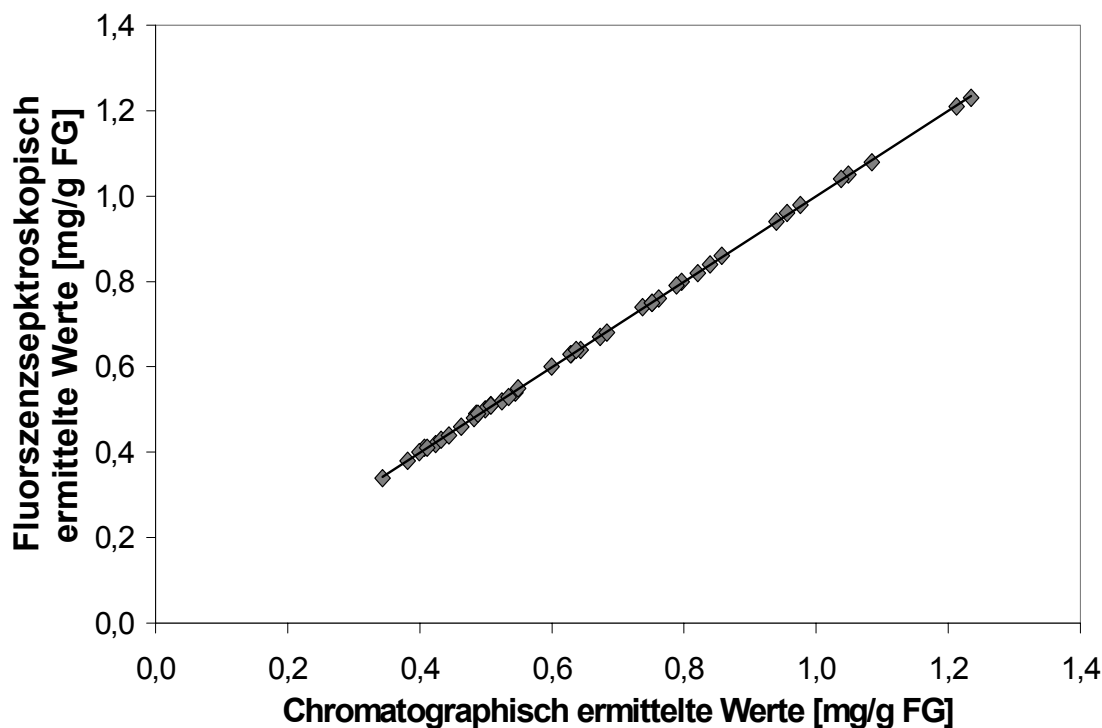


Abb. 4.4.9: Kalibrierung auf mittels direkter orthogonaler Signalkorrektur (*DOSC*) und Mittelwert-zentrierung vorverarbeiteten Rohdaten der Apfelfluoreszenzspektren. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 1,00$ und $b = 0,00$; $r_c^2 = 0,999$.

Ergebnisse aus Erdbeerversuchen bestätigen die im Beispiel der Äpfel gefundene Reduktion der für die Kalibrierung auf den Polyphenolgehalt nicht relevanten Varianz in den Fruchtfluoreszenzspektren nach Anwendung von *DOSC*. Der Gehalt der p-Cumaroyl-Glucose wurde hierbei an Erdbeeren drei verschiedener Reifestufen bestimmt (Tab. 4.4.8).

Tab. 4.4.8: Statistische Angaben zum Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose [mg/g Trockengewicht] in Erdbeeren verschiedener Reifestufen.

p-Cumaroyl-Glucose [mg/g TG]	Reifestufe 1	Reifestufe 2	Reifestufe 3
Mittelwert	0,07	0,22	0,22
Standardabweichung	0,05	0,08	0,14
Minimum	0,02	0,08	0,09
Maximum	0,17	0,37	0,48

In der ersten Reifestufe waren grünlich-weiße Beeren, in der zweiten hellrote mit weißer Spitze und in der dritten dunkelrote Früchte enthalten. Die Erdbeeren wiesen somit bereits visuell unterschiedliche Antho-

cyangehalte auf. Ein Einfluss der Fruchthanthocyane auf die gemessenen Intensitäten durch Löschungseffekte kann daher angenommen werden. In der chromatographischen Analyse wurde festgestellt, dass die Früchte der ersten Reifestufe im Vergleich zu den anderen beiden einen geringeren Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose aufweisen. Die Früchte der zweiten und dritten Reifestufe unterschieden sich nicht signifikant.

Die in Abb. 4.4.10 dargestellten Fluoreszenzspektren der Erdbeeren zeigen jedoch die höchste Fluoreszenzintensität bei den Früchten der ersten Reifestufe und die niedrigste bei denen der dritten entsprechend der Annahme einer deutlichen Reabsorption durch die Fruchthanthocyane. Im Vergleich dazu erscheinen die mit *DOSC* korrigierten Fluoreszenzintensitäten der drei Reifestufen nach Abzug von zwei Faktoren entsprechend der vorliegenden Gehalte an p-Cumaroyl-Glucose. Die *DOSC*-vorverarbeitete Fluoreszenzintensität gemessen an Erdbeeren der dritten Reifestufe mit dem höchsten Phenolgehalt ist am größten (Abb. 4.4.11).

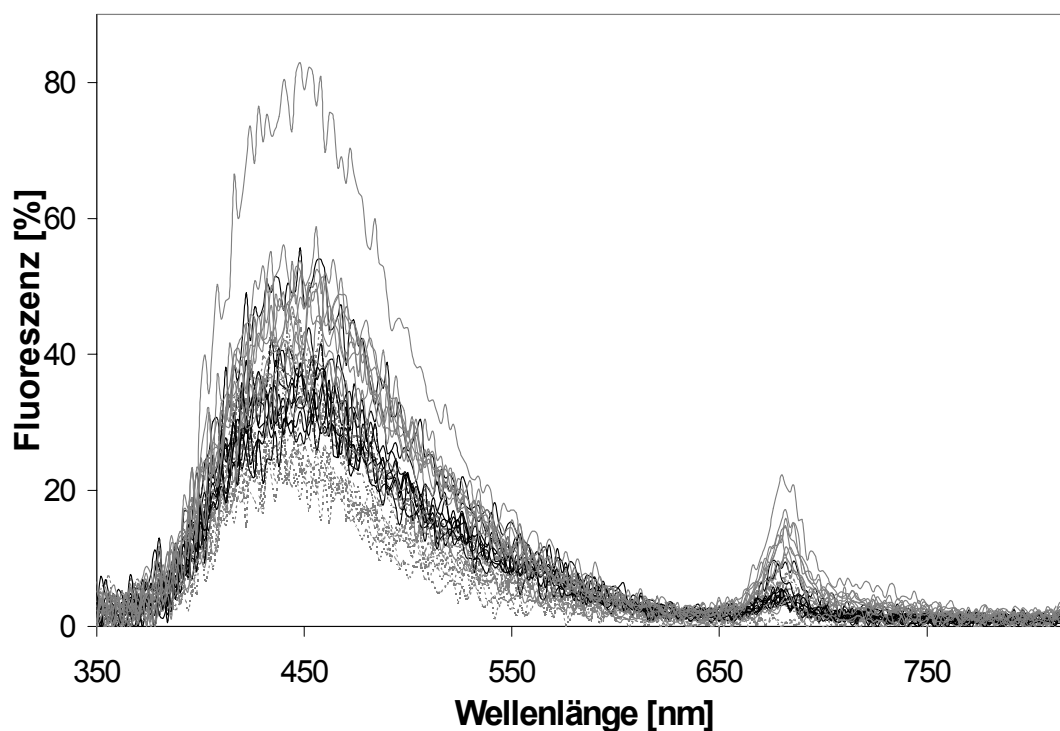


Abb. 4.4.10: Fluoreszenzspektren gemessen an Erdbeeren der Reifestufe 1 (grau—), Reifestufe 2 (schwarz—) und Reifestufe 3 (grau---).

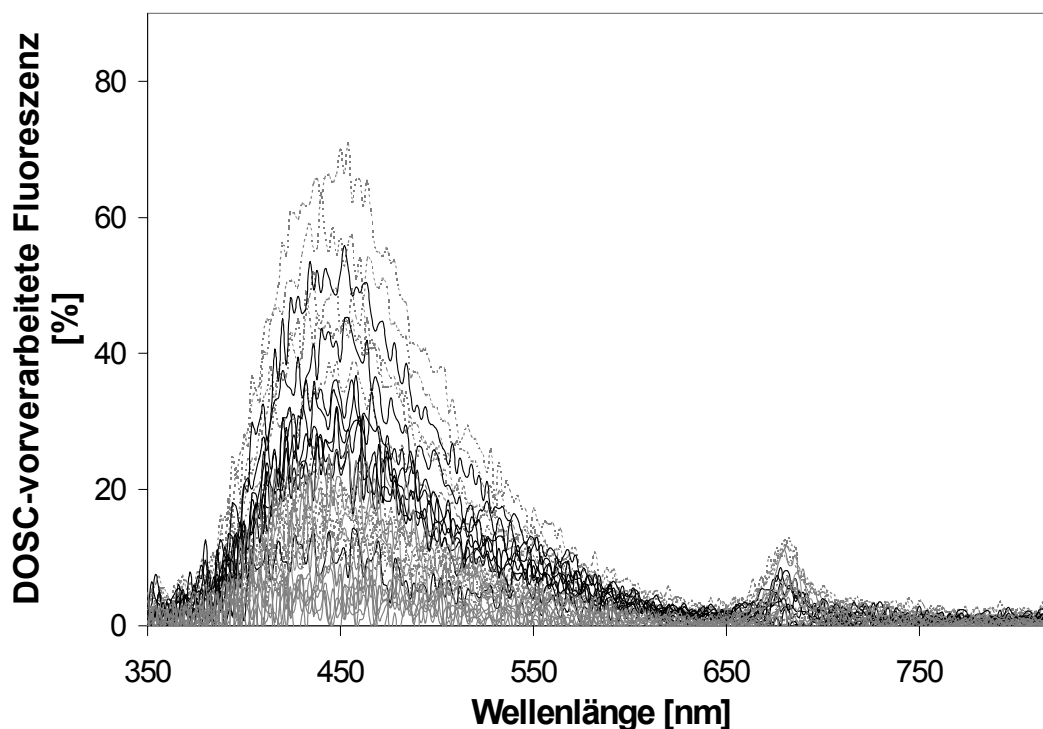


Abb. 4.4.11: Fluoreszenzspektren gemessen an Erdbeeren der Reifestufe 1 (grau—), Reifestufe 2 (schwarz—) und Reifestufe 3 (grau---) nach Entfernung von zwei *DOSC*-Faktoren mit für den Gehalt der p-Cumaroyl-Glucose nicht relevanten Informationen aus der spektralen Datenmatrix.

Die Erdbeerfluoreszenzspektren wurden dementsprechend mit einem bzw. zwei *DOSC*-Faktoren vorverarbeitet und die bereits zuvor erprobten Signalvorverarbeitungsmethoden für die *PLS* Regression wurden getestet. Die Entfernung von zwei Faktoren mit orthogonaler Information zum Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose aus der spektralen Datenmatrix und die Mittelwertzentrierung über die Proben ergaben auch bei den Messungen an Erdbeeren das Kalibriermodell mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß ($r_c^2 = 1,000$) und dem geringsten Fehler in der Kreuzvalidierung (0,19 %) bei vier latenten Variablen (Abb. 4.4.12).

Nachdem die für den Gehalt des Polyphenols nicht relevante und somit störende Information in den Fluoreszenzspektren entfernt wurde, wurde der *DOSC*-korrigierte Datensatz der Apfel- und der Erdbeerfluoreszenzspektren erneut mit Hilfe des genetischen Algorithmus hinsichtlich der Wellenlängenselektion bearbeitet. Die ausgewählten Wellenlängen beider Kalibriermodelle liegen hauptsächlich im blau-grünen Bereich (Tab. 4.4.9). In diesem Bereich wurde auch die maximale Fluoreszenzintensität der Phenolstandards der Hydroxyzimtsäuren gemessen.

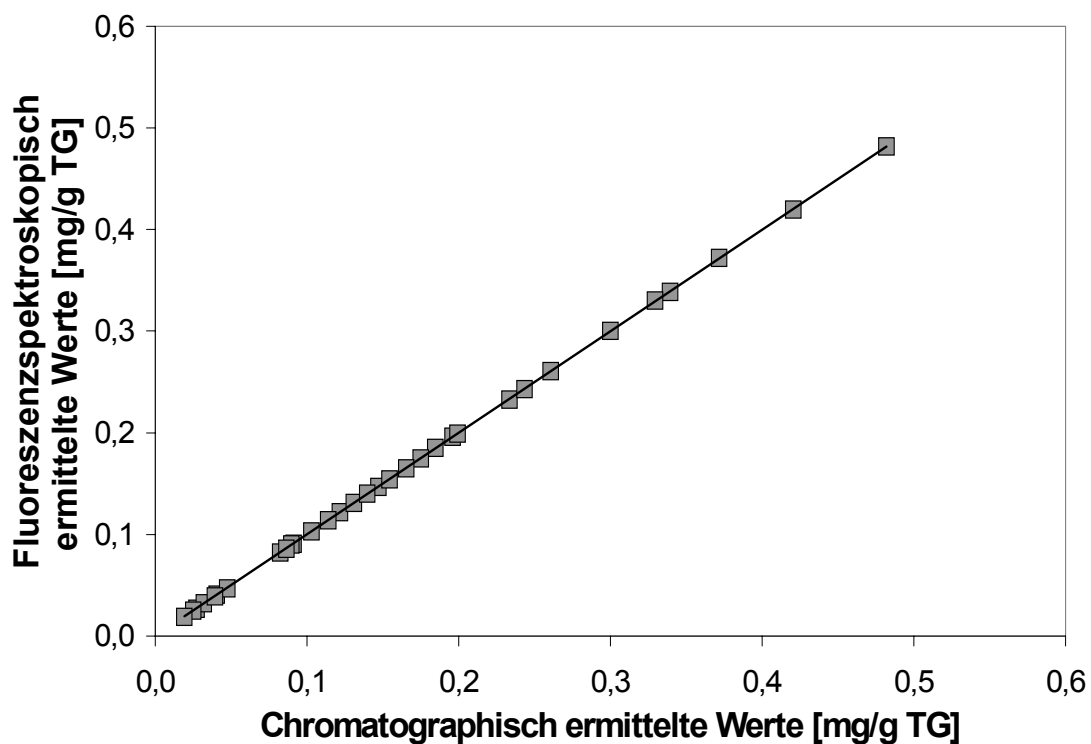


Abb. 4.4.12: Kalibrierung auf mittels direkter orthogonaler Signalkorrektur (*DOSC*) und Mittelwert-zentrierung vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a = 1,00$ und $b = 0,00$; $r_c^2 = 1,000$.

Tab. 4.4.9: Die mit Hilfe der Methode der genetischen Algorithmen ausgewählten Wellenlängenbereiche für auf zwei *DOSC*-Faktoren reduzierte Apfel- und Erdbeerfluoreszenzspektren.

Produkt	Wellenlängen [nm]
Apfel	386-466, 478-482
Erdbeere	416, 422-432, 438-454, 472-488

4.5 Kalibrierung und Validierung

Möglichkeiten einer zerstörungsfreien Fruchtpolyphenolanalyse mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse wurde am Beispiel von Hydroxyzimtsäuren untersucht. Mit Hilfe multivariater Auswerteverfahren wurden Kalibriermodelle auf der Basis von zerstörungsfrei aufgezeichneten Erdbeerfluoreszenzspektren und chromatographisch ermittelten Referenzdaten erarbeitet. Die Fehlerbetrachtung in der Kalibrierung sowie in der Kreuzvalidierung und das Bestimmtheitsmaß dienten als Bewertungskriterien für die Qualität der Kalibrierungen. Nach Anwendung verschiedener Signal- und Datenvorverarbeitungsmethoden ergaben die mit der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) vorverarbeiteten Fruchtfluoreszenzspektren für die jeweiligen Modelle die höchsten Bestimmtheitsmaße (r_c^2) mit den geringsten Fehlern in der Kreuzvalidierung (*rmsecv*). Das Fruchtmaterial weist als lebendes Produkt genotypisch sowie durch endogene (z.B. Reifegrad) und exogene Einflussfaktoren (z.B. Standortbedingungen) erheblichen Unterschiede in der Fruchthaltstoffzusammensetzung auf. Generelle Aussagen über den Phenolgehalt von Einzelfrüchten auf der Basis von einzelnen Stichproben sind wenig aussagekräftig. Für die Inhaltsstoffbestimmung in der gartenbaulichen Praxis ist es daher notwendig, die auf der begrenzten Anzahl an Proben aufgebauten Kalibriermodelle auf einem neuen, unabhängigen Datensatz zu testen, um Aussagen über die Qualität der Modelle treffen zu können.

4.5.1 Validierung der Kalibriermodelle

Für die Kalibrierung wurden frisch geerntete Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) der Sorte 'Elsanta' ($n = 32$) in drei verschiedenen Reifestufen verwendet. Mit der ersten Reifestufe wurden die grünlich-weißen Beeren, mit der zweiten die hellroten mit weißer Spitze und mit der dritten die dunkelroten Früchte bezeichnet. Die Kalibriermodelle wurden entsprechend den zuvor gezeigten Verfahren auf der Basis der an den Früchten aufgezeichneten Fluoreszenzspektren und den parallel dazu nass-chemisch mit der Hochdrucks-Flüssigkeitschromatographie (*HPLC*) ermittelten Gehalten an p-Cumaroyl-Glucose erarbeitet.

Im Abstand von einer Woche wurden weitere Erdbeeren der Sorte 'Elsanta' ($n = 35$) entsprechender Reifestufen am selben Standort geerntet und zerstörungsfrei mit der laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie und chromatographisch gemessen. Anschließend wurde der neue, unabhängige Datensatz (*Test-Set*) der Fluoreszenzspektren und Trockengewichtsangaben mit Hilfe der zuvor erarbeiteten Kalibriermodellen der Erdbeeren des ersten Erntetermins ausgewertet.

Die chromatographischen Gehaltsangaben an p-Cumaroyl-Glucose des *Test-Set*-Datensatzes bewegen sich für die Früchte der zweiten und dritten Reifestufe in ähnlichen Gehaltsbereichen wie die der Erdbeeren für die Kalibrierung (Tab. 4.5.1). Bei den unreifen Früchten der ersten Reifestufe wurde im *Test-Set* hingegen ein erhöhter Maximalgehalt im Vergleich zur ersten Ernte chromatographisch ermittelt.

Tab. 4.5.1: Statistische Angaben zum Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose [mg/g Trockengewicht] in Erdbeeren verschiedener Reifestufen des Kalibrier- sowie des *Test-Set*-Datensatzes.

Datensatz	p-Cumaroyl-Glucose [mg/g TG]	Reifestufe 1	Reifestufe 2	Reifestufe 3
Kalibrierung	Mittelwert	0,07	0,22	0,22
	Standardabweichung	0,05	0,08	0,14
	Minimum	0,02	0,08	0,09
	Maximum	0,17	0,37	0,48
Validierung	Mittelwert	0,13	0,20	0,21
	Standardabweichung	0,09	0,09	0,11
	Minimum	0,03	0,10	0,08
	Maximum	0,29	0,39	0,41

Zur Bewertung der Kalibriermodelle wurden die Bestimmtheitsmaße des *Test-Set*-Datensatzes (r_v^2) sowie die Fehler in der Validierung ermittelt. Um den Einfluss der Dimensionalität (Anzahl an latenten Variablen) der Kalibriermodelle in der Validierung zu testen, wurden jeweils die ersten vier latenten Variablen in jedem Modell untersucht. Die Datenvorverarbeitung der Erdbeerfluoreszenzspektren mit der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) führte zu den höchsten Bestimmtheitsmaßen sowohl der Kalibrier- als auch der *Test-Set*-Modelle (Tab. 4.5.2) und den niedrigsten Fehlern sowohl in der Kalibrierung (*rmsecv*) als auch in der Validierung (*rmsep*) (Tab. 4.5.3). Mit Hilfe der Entfernung von zwei Faktoren orthogonaler Information aus dem spektralen Datensatz ergaben sich vergleichsweise niedrigere *rmsep*-Werte, als nach Abzug lediglich eines *DOSC*-Faktors.

Zusätzlich wurden die Fluoreszenzspektren mit vorheriger Anwendung der *DOSC* über die Proben mittelwertzentriert (MZ_p) bzw. autoskaliert ($AUTO_p$). Die Fehler in der Kalibrierung waren nach MZ_p geringer als nach $AUTO_p$ während die Bestimmtheitsmaße beider Signalvorverarbeitungen ähnliche Ergebnisse zeigten. Nach Validierung der Kalibriermodelle mit dem *Test-Set*-Datensatz wurden hingegen geringere Fehler in der Validierung nach der Autoskalierung (*rmsep* von 50 % bis 60 %) der mit *DOSC* vorverarbeiteten Fluoreszenzdaten ermittelt als bei den zusätzlich mittelwertzentrierten Spektren (*rmsep* > 73 %).

Tab. 4.5.2 Anzahl latenter Variablen (LV) und Bestimmtheitsmaße der Kalibrierung (r_c^2) sowie der Validierung (r_v^2) der mit Hilfe von *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodele für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der Fruchtfluoreszenzspektren mit bzw. ohne direkte orthogonale Signalkorrektur (*DOSC*).

Vorverarbeitung	LV	r_c^2	r_v^2
Mittelwertzentrierung	1	0,133	0,074
	2	0,658	0,137
	3	0,782	0,085
	4	0,879	0,042
Autoskalierung	1	0,163	0,108
	2	0,502	0,096
	3	0,846	0,023
	4	0,941	0,027
DOSC (1 Faktor) und Mittelwertzentrierung	1	1,000	0,999
	2	1,000	0,999
	3	1,000	0,999
	4	1,000	0,999
DOSC (1 Faktor) und Autoskalierung	1	0,952	0,905
	2	0,992	0,988
	3	0,999	0,994
	4	0,999	0,995
DOSC (2 Faktoren) und Mittelwertzentrierung	1	1,000	1,000
	2	1,000	1,000
	3	1,000	1,000
	4	1,000	1,000
DOSC (2 Faktoren) und Autoskalierung	1	0,983	0,980
	2	0,995	0,987
	3	0,999	0,996
	4	0,999	0,996

Bei den Kalibriermodellen nach MZ_p bzw. $AUTO_p$ der Fluoreszenzspektren ohne direkte orthogonale Signalkorrektur lagen die Fehler in der Validierung bei $rmsep > 64\%$ bei gleichzeitig geringen Bestimmtheitsmaßen ($r_v^2 < 0,20$). Während bei den Kalibriermodellen auf den mittelwertzentrierten bzw. autoskalierten Rohdaten erheblich geringere Bestimmtheitsmaße der Validierung ermittelt wurden, wurden bei den vorab mit *DOSC* vorverarbeiteten Fluoreszenzspektren ebenfalls hohe Werte erreicht ($r_v^2 = 0,97$ bis $1,00$).

Die Kalibriermodelle, die auf den Rohdaten gebildet wurden, zeigten mit und ohne zusätzliche direkte orthogonale Signalkorrektur (*DOSC*) der Fluoreszenzspektren keine niedrigeren Fehler in der Validierung als bei den autoskalierten Modellen.

Tab. 4.5.3 Anzahl latenter Variablen (*LV*), Kalibrierfehler (*rmsec*), Fehler in der Kreuzvalidierung (*rmsecv*) sowie in der Validierung (*rmsep*) der mit Hilfe von *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der Fruchtfluoreszenzspektren mit bzw. ohne direkte orthogonale Signalkorrektur (*DOSC*).

Vorverarbeitung	<i>LV</i>	<i>rmsec</i> [mg/g TG]	<i>rmsec</i> [%]	<i>rmsecv</i> [mg/g TG]	<i>rmsecv</i> [%]	<i>rmsep</i> [mg/g TG]	<i>rmsep</i> [%]
Mittelwert-zentrierung	1	0,112	66,56	0,125	73,95	0,128	71,28
	2	0,070	41,82	0,174	103,14	0,131	73,18
	3	0,056	33,35	0,164	97,15	0,116	64,78
	4	0,042	24,86	0,170	101,14	0,170	94,92
Autoskalierung	1	0,110	65,37	0,125	74,50	0,110	64,68
	2	0,085	50,43	0,142	84,14	0,085	81,60
	3	0,047	28,04	0,164	97,40	0,047	74,75
	4	0,030	17,36	0,170	100,73	0,029	70,16
DOSC (1 Faktor) und Mittelwert-zentrierung	1	0,000	0,19	0,000	0,43	0,132	73,82
	2	0,000	0,10	0,000	0,28	0,132	73,71
	3	0,000	0,05	0,000	0,23	0,132	73,78
	4	0,000	0,03	0,000	0,21	0,132	73,79

DOSC (1 Faktor) und Autoskalierung	1	0,026	15,66	0,030	17,65	0,094	52,37
	2	0,011	6,34	0,019	11,21	0,114	63,54
	3	0,004	2,24	0,014	8,32	0,124	68,95
	4	0,002	1,16	0,013	7,68	0,124	69,41
DOSC (2 Faktoren) und Mittel- wertzentrierung	1	0,000	0,18	0,000	0,32	0,132	73,90
	2	0,000	0,05	0,000	0,23	0,132	73,93
	3	0,000	0,03	0,000	0,21	0,132	73,94
	4	0,000	0,01	0,000	0,19	0,132	73,95
DOSC (2 Faktoren) und Auto- skalierung	1	0,016	9,36	0,019	11,01	0,090	50,03
	2	0,009	5,27	0,014	8,51	0,096	53,35
	3	0,003	1,74	0,010	6,22	0,103	57,22
	4	0,001	0,60	0,009	5,61	0,105	58,36

Bei dem Kalibriermodell auf den mit MZ_P vorverarbeiteten Erdbeerfluoreszenzspektren wird der Einfluss der optimalen Anzahl latenter Variablen der Kalibriermodelle in der Validierung deutlich. Während für die Kalibrierung eine latente Variable anhand des niedrigsten Fehlers in der Kreuzvalidierung ($rmsecv = 73,95\%$) ausgewählt wurde, war der Fehler in der Validierung für drei LV am geringsten ($rmsep = 64,78\%$). Bei den autoskalierten Spektren war hingegen der Fehler sowohl in der Kalibrierung ($rmsecv = 74,50\%$) als auch in der Validierung ($rmsep = 64,68\%$) jeweils für eine latente Variable am niedrigsten. Die Kalibriermodelle, die auf den Erdbeerfluoreszenzspektren nach MZ_P und $AUTO_P$ und dem Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose erarbeitet wurden, führten jedoch für keine der hier getesteten Anzahl an latenten Variablen zu robusten Modellen, da sie hohe Fehler in der Kalibrierung ($rmsecv > 70\%$) und in der Validierung ($rmsep > 64\%$) aufwiesen bei gleichzeitig geringen Bestimmtheitsmaßen vor allem in den *Test-Set*-Datensätzen ($r^2_v < 0,20$).

Bei der Datenvorverarbeitung mit *DOSC* und anschließender Anwendung von MZ_P bzw. $AUTO_P$ wurden für die Kalibriermodelle hingegen hohe Bestimmtheitsmaße in der Kalibrierung ($r^2_c > 0,95$) und geringe Fehler in der Kreuzvalidierung ($rmsecv < 20\%$) ermittelt. Hier zeigte sich erneut ein Einfluss der optimalen Anzahl an LV für die Kalibriermodelle bei der *Test-Set*-Validierung. Während bei Abzug eines bzw. zwei *DOSC*-Faktoren und zusätzlicher Signalvorverarbeitung die Fehler in der Kreuzvalidierung jeweils bei der Verwendung von vier latenten Variablen am niedrigsten waren, wurden die geringsten $rmsep$ -Werte für die Kalibriermodelle mit einer LV errechnet. Gleichzeitig führten alle mit *DOSC* vorverarbeiteten Modelle für eine latente Variable zu hohen Bestimmtheitsmaßen der Kalibrierung und der Validierung ($r^2 > 0,98$).

Die auf die Erdbeerfluoreszenzspektren angewendete Datenvorverarbeitungsmethode der direkten orthogonalen Signalkorrektur führte nach Abzug von zwei *DOSC*-Faktoren und anschließender $AUTO_P$ der spektralen X -Matrix zu den robustesten Kalibriermodellen mit den niedrigsten Fehlern in der Validierung ($rmsep = 50 - 60\%$) bei der Bestimmung des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose. In Abb. 4.5.1 sind die Modelle für die Kalibrierung und die Validierung nach Abzug von zwei *DOSC*-Faktoren aus der spektralen Datenmatrix und anschließender Autoskalierung über die Proben für die Modelle mit einer latenten Variablen dargestellt.

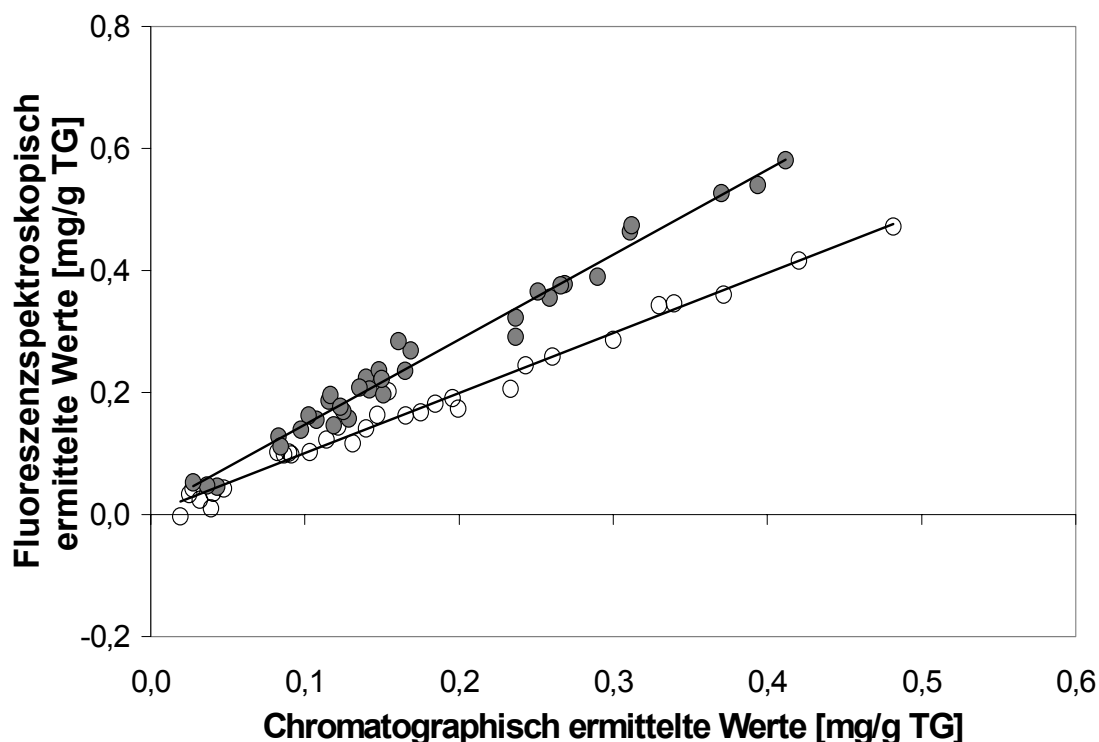


Abb. 4.5.1: Kalibrierung (weiß) und Test-Set (grau) auf mittels direkter orthogonaler Signalkorrektur (*DOSC*) und Autoskalierung vorverarbeiteten Rohdaten der Erdbeerfluoreszenzspektren. Regressionsgleichung: $y = ax + b$; $a_c = 0,98$, $a_v = 1,39$ und $b_c = 0,00$, $b_v = 0,01$; $r_c^2 = 0,983$ und $r_v^2 = 0,980$.

4.5.2 Einfluss der Reabsorptionseffekte auf die Kalibriermodelle

Um die in den unterschiedlichen Reifestufen zu erwartenden Reabsorptionseffekte der Anthocyane bereits aus den Fluoreszenzspektren filtern zu können, wurden parallel an den Früchten Reflexionsmessspektren aufgezeichnet. Die Spektren der Fluoreszenz und der Reflexion wurden zunächst unabhängig voneinander über die Proben mittelwertzentriert bzw. autoskaliert um gerätebedingte Einflüsse und Einflüsse der Streueigenschaften des Gewebes in den Spektren zu vermindern. Das Fluoreszenzsignal wurde folgend mit Hilfe der Reflexion entsprechend der wellenlängenabhängigen Intensitäten korrigiert (Fluoreszenz-emission/Reflexion).

Im Vergleich zu den unkorrigierten Fluoreszenzspektren sind die Bestimmtheitsmaße sowohl der Kalibrierung als auch der Validierung erheblich geringer (Tab. 4.5.4). Allerdings wird bei einem Kalibriermodell mit vier latenten Variablen ein hoher r_c^2 -Wert erreicht ($r_c^2 = 0,723$). Hingegen zeigen die Bestimmtheitsmaße der hier dargestellten mit der Reflexion korrigierten Kalibriermodelle keine Korrelation der Daten im *Test-Set*-Datensatz ($r_v^2 < 0,05\%$). Die Fehler in der Validierung bei den reflexionskorrigierten Spektren nach Anwendung von MZ_P und Abzug von zwei *DOSC*-Faktoren sind im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen auf unkorrigierten Fluoreszenzspektren geringer als bei der Autoskalierung über die Proben.

Tab. 4.5.4 Anzahl latenter Variablen (LV) und Bestimmtheitsmaße der Kalibrierung (r_c^2) sowie der Validierung (r_v^2) der mit Hilfe von *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodele für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der mit Hilfe der Reflexionspektren korrigierten Fruchtfluoreszenzspektren und direkter orthogonaler Signalkorrektur (*DOSC*).

Vorverarbeitung	LV	r_c^2	r_v^2
DOSC (2 Faktoren) und Mittelwertzentrierung	1	0,186	0,007
	2	0,306	0,037
	3	0,375	0,046
	4	0,377	0,053
DOSC (2 Faktoren) und Autoskalierung	1	0,272	0,001
	2	0,527	0,032
	3	0,714	0,028
	4	0,723	0,017

Tab. 4.5.5 Anzahl latenter Variablen (*LV*), Kalibrierfehler (*rmsec*), Fehler in der Kreuzvalidierung (*rmsecv*) sowie in der Validierung (*rmsep*) der mit Hilfe von *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse ermittelten Kalibriermodelle für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren auf der Basis der mit Hilfe der mittelwertzentrierten Reflexionsspektren korrigierten mittelwertzentrierten Fruchtfluoreszenzspektren und direkter orthogonaler Signalkorrektur (*DOSC*).

Vorverarbeitung	<i>LV</i>	<i>rmsec</i> [mg/g TG]	<i>rmsec</i> [%]	<i>rmsecv</i> [mg/g TG]	<i>rmsecv</i> [%]	<i>rmsep</i> [mg/g TG]	<i>rmsep</i> [%]
Mittelwertzentrierung und DOSC (2 Faktoren)	1	0,109	64,74	0,133	78,66	0,099	55,45
	2	0,103	61,13	0,138	82,08	0,099	54,99
	3	0,100	59,53	0,144	85,48	0,099	55,10
	4	0,096	56,80	0,158	93,51	0,101	56,59
Auto-skalierung und DOSC (2 Faktoren)	1	0,103	61,00	0,127	75,29	0,128	71,20
	2	0,087	51,55	0,130	77,27	0,160	89,39
	3	0,077	45,53	0,144	85,55	0,212	118,15
	4	0,067	39,70	0,162	96,30	0,251	139,81

5 Diskussion

5.1 Varianzanalyse der Fluoreszenz von Gartenbauprodukten

5.1.1 Fluoreszenzsignal

Die Fluoreszenzanalyse in den Agrar- und Gartenbauwissenschaften wurde zunächst schwerpunktmäßig im Bereich der Kinetik der Chlorophyllfluoreszenz eingesetzt (KAUTSKY und HIRSCH, 1931; BUSCHMANN und GRUMBACH, 1986; LICHTENTHALER und RINDERLE, 1988; KRAUSE und WEIS, 1991; VON WILLERT et al., 1995). Zusätzlich zu den Kinetikmessungen wurden spektroskopische Verfahren oder Imaging-Techniken erprobt, um die Fluoreszenz der Fluorophore in Pflanzen und Gartenbauprodukten zu untersuchen (CHAPELLE et al., 1984; Herppich, 2001). Dabei wurde in letzter Zeit auch zunehmend das Fluoreszenzverhalten von Inhaltsstoffen, die im blau-grünen Wellenlängenbereich fluoreszieren, durchleuchtet (GOULAS et al., 1990; MORALES et al., 1994; LICHTENTHALER, 1996; LICHTENTHALER et al., 1996; LANG et al., 1996; SUBHASH et al., 1999; BUSCHMANN und LICHTENTHALER, 1998; BUSCHMANN et al., 2000). Möglichkeiten des Einsatzes der Fluoreszenzspektroskopie zur qualitativen Untersuchung an gartenbaulichen Produkten im Bereich des Nachernte- und Verarbeitungsprozesses wurden erst in den letzten Jahren und lediglich in Ansätzen erforscht (DEELL et al., 1996; MAY und TAUSCHER, 1998; NEDBAL et al., 2000; CISCATO et al., 2001; KIM et al., 2001, 2002; TAKEUCHI et al., 2002; MOSHOU et al., 2003; ZUDE, 2004). Darüber hinaus sind nur wenige Untersuchungen zur quantitativen Fluoreszenzanalyse von Inhaltsstoffen in verschiedenen Arbeitsgruppen an verarbeiteten Gartenbauprodukten und Nahrungsmitteln durchgeführt worden (BIRLOUEZ-ARAGON et al., 2002; KUCZYSNKI, 2003; CHEIKHOUSMAN et al., 2005). Der Einsatz von mathematischen Auswertungsmethoden für die qualitative und quantitative Bewertung gartenbaulicher Produkte gewinnt dabei in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung (BRO et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit erfolgten Messungen an Apfel, Erdbeere und Möhre, deren Fluoreszenzspektren aufgrund der zahlreichen in den Proben enthaltenen Inhaltsstoffe keine Fluoreszenzintensitätsmaxima an spezifischen Wellenlängen aufweisen. Die zerstörungsfrei gemessenen Fluoreszenzspektren zeichnen sich durch sehr breite *Peaks* aus, die die Summe aller fluoreszierenden Komponenten darstellen. Diese zerstörungsfrei aufgezeichneten Summenspektren wurden hinsichtlich möglicher Anwendungen in der gartenbaulichen Praxis untersucht.

Die Fluoreszenzsignale des Apfels und der Erdbeere zeigten ausgeprägte Fluoreszenzintensitäten in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm (blau-grün) und ein zweites Maximum bei ca. 680 nm (rot). Die Möhre zeigt im Vergleich eine geringere Fluoreszenzintensität im blau-grünen Wellenlängenbereich. Es kann angenommen werden, dass dies bedingt ist durch die im Vergleich geringeren Gehalte an Polyphenolen (hauptsächlich Chlorogensäure mit einem Gehalt von durchschnittlich 2,3 - 12,1 mg / 100 g Frischgewicht (HERRMANN, 2001)) sowie den wesentlich höheren Gehalten an den im Bereich von 400 nm bis 500 nm stark absorbierenden Carotinoiden (BUSCHMANN und GRUMBACH, 1985; STÖBER und

LICHTENTHALER, 1993; RICHTER, 1997). Letztere beeinflussen die Fluoreszenz der Phenolverbindungen ihren Absorptionscharakteristika entsprechend durch Reabsorptionseffekte (Abb. 4.2.2)

Ein auch in der Absorptionsspektroskopie häufig verwendeter Ansatz ist es, mit Hilfe von Ableitungen Extremstellen und somit einzelne *Peaks* sichtbar zu machen (GREEN und O'HAVER, 1974; ZUDE et al., 2002; ZUDE, 2003; WULF und ZUDE, 2003a). Während die erste Ableitung vorwiegend eingesetzt wird, um Basislinienverschiebung über das gesamte Spektrum zu korrigieren, dienen die zweite und weitere Ableitungen auch der Trennung sich überlagernder Fluoreszenzspektren einzelner fluoreszierender Moleküle. Es wird jedoch gleichzeitig messtechnisch bedingtes Rauschen bei der empfindlichen Signaldetektion der schwachen Fluoreszenzstrahlung verstärkt. Mit jeder weiteren Ableitung wird das Signal-Rausch-Verhältnis gesteigert (MAESSCHALCK et al., 1999). In den vorliegenden Versuchen stellte die Auswertung der zweiten Ableitung einen angemessenen Kompromiss in der verbesserten Auflösung der *Peaks* bei relativ geringer Rauschverstärkung dar. Durch diese Methode konnten in dem vorliegenden Versuch bei Apfel Maxima an den Wellenlängen 415 nm, 450 nm, 480 nm und 680 nm (Abb. 4.2.4) identifiziert werden. Die deutlich höhere Anzahl der unterschiedlichen Fluorophore im blau-grünen Wellenlängenbereich wird hierdurch jedoch nicht separiert erkannt. Zudem wurden in Folgeversuchen häufig andere Maxima gefunden, was durch die unterschiedliche Inhaltsstoffzusammensetzung jeder einzelnen Frucht bedingt ist. Neben den für bestimmte Fruchtinhaltsstoffe charakteristischen Autofluoreszenzen (z.B. von Polyphenolen) können auch andere Moleküle durch Reabsorptions- und Löschungseffekte (z.B. Carotinoide, Anthocyane, etc.) die Fluoreszenzspektren beeinflussen (MORALES et al., 1994; MAY und TAUSCHER, 1998; MEYER et al., 2002). Diese Reabsorptionseffekte führen zu einer Intensitätsverringerung des detektierten Fluoreszenzsignals, wodurch die instrumentelle Analyse der phenolischen Verbindungen erschwert wird.

Im roten Wellenlängenbereich sind in beiden Früchten enthaltene Chlorophylle für das Fluoreszenzsignal verantwortlich. Sie zeigen eine deutliche Emission bei 680 nm (Abb. 4.2.2), absorbieren hingegen sowohl im Bereich von 400 nm bis 480 nm als auch bei 660 nm (z.B. in Methanol und Ether) (BUSCHMANN und GRUMBACH, 1985; LICHTENTHALER und RINDERLE, 1988; VON WILLERT et al., 1995; DEELL et al., 1996; RICHTER, 1997; ANDERSON et al., 1998). Im blau-grünen Wellenlängenbereich fluoreszieren in erster Linie phenolische Verbindungen (GOULAS et al., 1990; MORALES et al., 1996; LIAKOPOULOS et al., 2001; MEYER et al., 2002). Die im Apfel nachgewiesene Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure und Chlorogensäure wurden an Standards gemessen und zeigten Maxima in der Fluoreszenzintensität um 440 nm (Abb. 4.2.3). Die Chlorophylle reabsorbieren somit die von den Phenolen im blauen Wellenlängenbereich emittierte Fluoreszenzstrahlung (STOBER und LICHTENTHALER, 1993; MORALES et al., 1994).

Neben der Reabsorption der emittierten Strahlung fluoreszierender Moleküle kann es zudem zu einer Konkurrenz um das Anregungslicht kommen. In Äpfeln und in Erdbeeren agieren die Anthocyane und Quercetin-Glykoside u.a. durch Absorption als UV-Strahlungs-Blocker (MERZLYAK, 2000; AWAD et al.,

2001; MEYER et al., 2002; MERZLYAK et al., 2005). Sie absorbieren somit auch das in der Fluoreszenzanalytik verwendete Anregungslicht. Als Folge kann weniger Strahlung von den Fruchtfluorophoren absorbiert werden. Die Gruppe der Anthocyane und weitere Moleküle mit Absorption im Bereich des Anregungslichtes limitieren somit die Anregung der Fluorophore. Da die Fluoreszenzintensität proportional mit der Strahlungsintensität des Anregungslichts zunimmt, verringert sich durch das Vorhandensein von im *UV*-Bereich stark absorbierenden Molekülen die Intensität der Fluoreszenzemission (FÖRSTER, 1951; SCHWEDT, 1981). Zusätzlich absorbieren die Anthocyane Strahlung im blau-grünen Wellenlängenbereich und reabsorbieren wie die Chlorophylle die in diesem Bereich emittierte Fluoreszenzstrahlung. Durch beide Effekte kommt es zu einer Reduktion der messbaren Fluoreszenzintensitäten.

5.1.2 Monitoring im Lager

Lagerung von Äpfeln

Im Verlauf der Lagerung von Äpfeln sind die auftretenden Veränderungen und Intensitätsverluste in den Fluoreszenzspektren auf physiologische und folgend physiko-chemische und bio-chemische Veränderungen im Fruchtgewebe zurückzuführen. Die Bedingungen des Kühllagers sowie bei Lagerung in kontrollierter Atmosphäre (*CA*) sind in der obstbaulichen Praxis so gewählt, dass durch niedrige Temperaturen die Respirationsrate der Früchte reduziert ist und es somit zu einem verlangsamten Stoffwechsel kommt. Zusätzlich wird durch die veränderte Atmosphäre mit 1-2 % O_2 und 2-5 % CO_2 im *CA*-Lager die Atmung weiter vermindert und darüber hinaus die Ethylenentwicklung limitiert. Die Prozesse der Reifung und Seneszenz laufen unter diesen Bedingungen vermindert ab, so dass die Produktqualität vergleichsweise langsamer abnimmt als im Kühllager (FRIEDRICH et al., 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei-jährigen Versuchen Fluoreszenzspektren wiederholt an Äpfeln während der Lagerung aufgezeichnet. Die Hauptkomponentenanalyse (*PCA*) wurde hierbei für die Datenauswertung der zerstörungsfrei aufgezeichneten Apfelfluoreszenzspektren eingesetzt. Mit dieser Methode werden die komplexen spektralen Datensätze auf wenige, die größte Varianz im Datensatz erklärenden Faktoren reduziert. Das für den Einsatz der qualitativen Bewertung von Gartenbauprodukten im Nachernte- und Verarbeitungsprozess erarbeitete Modell der *PCA* soll dabei auf eine möglichst geringe Anzahl an Hauptkomponenten reduziert werden, die reproduzierbar einen möglichst hohen Anteil der Varianz des Datensatzes abdecken. Ziel war anhand der graphischen Interpretation der Daten Rückschlüsse auf die Veränderungen der Produkte im Nachernteprozess zu ziehen. Am Beispiel von in kontrollierter Atmosphäre gelagerten Äpfeln wurden unterschiedliche Signalvorverarbeitungsmethoden für die Hauptkomponentenanalyse getestet. Die Autoskalierung über die Proben (*AUTO_P*) ist vor allem eine Möglichkeit Daten mit unterschiedlichen Einheiten in einem Kalibriermodell zu betrachten, wobei ihre Wertigkeit angeglichen wird. Zudem führt *AUTO_P* zu einer Verstärkung des Rauschens einer Variablen mit geringer Standardabweichung (WISE et al., 2003). Die Mittelwertzentrierung über die Proben (*MZ_P*) führte zu der deutlichsten Trennung der Daten der gelagerten von denen der ungelagerten Äpfel durch die Verschiebung des Schwerpunkts bezogen auf den Ursprung im Datenraum (Abb. 4.2.9). Bei Spektren, die alle

dieselbe Einheit besitzen, ist die MZ_p vorteilhaft, da davon auszugehen ist, dass Variablen (Wellenlängen) mit großen Variationen wichtiger für die Dateninterpretation sind, als solche mit kleineren Veränderungen und sie dementsprechend nicht in ihrer Wertigkeit reduziert werden sollten (WISE und GALLAGHER, 1998). Für die qualitative Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist die Derivativspektroskopie als Vorverarbeitungsmethode für die Hauptkomponentenanalyse nicht geeignet, da die Verstärkung des Rauschens die positiven Effekte überwiegt.

Während der Reifung und der anschließenden Seneszenz werden im Apfelgewebe die Chlorophylle abgebaut. Dies geschieht unabhängig von der Lagervariante, wird durch die Lagerung in kontrollierter Atmosphäre jedoch im Vergleich zur Kühllagerung verlangsamt. Die im roten Wellenlängenbereich auftretende Reduktion des Fluoreszenzsignals ist daher dem alterungsbedingten Abbau der bei 680 nm fluoreszierenden Chlorophylle zuzuschreiben (WULF et al., 2003a, 2003b). Zusätzlich kommt es zu einer spektralen Verschiebung der maximalen Intensität der Fluoreszenzemission. Diese resultiert aus der Umwandlung des Chlorophylls zu Abbauprodukten (MATILE et al., 1999), die in höheren Wellenlängen fluoreszieren (French et al., 1956; LÓPEZ-AYERRA et al., 1998) und am Ende nicht mehr fluoreszenzfähig sind (DANGL et al., 2000) und durch Veränderungen der Zellstruktur (vor allem Abbau der Chloroplasten und der D2-Komplexe) sowie die dadurch bedingte Änderung des pH -Wertes.

Diese Veränderungen treten bei einer Anregung mit Strahlung im blauen Wellenlängenbereich (488 nm) deutlich in Erscheinung (Abb. 4.2.11) und werden bei mit UV -Strahlung angeregten Spektren nur begrenzt erfasst. Folglich zeigen die mit der Hauptkomponentenanalyse erarbeiteten Modelle vor allem der mit 337 nm angeregten Fluoreszenzspektren kühlgelagerter Äpfel kaum Veränderungen im roten Wellenlängenbereich, obwohl der Chlorophyllabbau hier deutlich stärker ausgeprägt ist als bei der CA -Lagerung.

Der Gehalt an in Äpfeln enthaltenen Hydroxyzimtsäuren, die eine blaue Fluoreszenz emittieren, oder an Flavonoiden, die vor allem im gelb-orangen und teilweise im grün-gelben Wellenlängenbereich fluoreszieren (MORALES et al., 1996; MAY und TAUSCHER, 1998; LÜDEKER et al., 1999), wird im Laufe der Lagerung beider Lagervarianten hingegen nicht signifikant verändert, wie Versuche an den Sorten 'Jonagold' und 'Elstar' zeigten (AWAD und DEJAGER, 2000b). Somit ist die Fluoreszenzintensitätszunahme im blau-grünen Wellenlängenbereich der gelagerten Äpfel im Vergleich zu den frisch geernteten nicht auf einen erhöhten Gehalt der Polyphenole zurückzuführen. Vielmehr kann dieser Intensitätsanstieg auf die Reduktion der Chlorophylle und die dadurch bedingten Verminderung der Reabsorptionseffekte zurückgeführt werden. Ein Einfluss auf das Fluoreszenzsignal ist auch durch Veränderungen von Gewebe- und Zellstrukturen zu erwarten. Nach viermonatiger Kühllagerung bei Äpfeln der Sorte 'Elstar' kommt es zu einem Zerfall des Zellgefüges, so dass sich die Inhaltsstoffe der Zellwände mit denen der Vakuolen vermischen (TIJSKENS und DE JAGER, 1999; VERAVERBEKE, 2001). Das kann wiederum zu einer Veränderung des pH -Wertes des das Fluorophor umgebenden Milieus führen, welche eine Wellenlängenverschiebung und/oder Fluoreszenzintensitätsveränderungen auch im blau-grünen Bereich des Spektrums zur Folge hat.

Neue fluoreszierende Verbindungen können gebildet sowie Fluorophore abgebaut werden. Darüber hinaus können als Folge der Zellstrukturveränderungen veränderte Streueigenschaften möglicherweise auch einen Einfluss auf das detektierte Signal haben.

Die Gehalte an Anthocyanen und Carotinoiden, die ebenfalls durch Reabsorptionseffekte auf die Fluoreszenzintensität im blau-grünen Wellenlängenbereich Einfluss nehmen können, unterliegen während der Lagerung der Äpfel beider Lagervarianten nur geringfügigen Veränderungen (FRIEDRICH et al., 1986; LEJA et al., 2003; AWAD und DE JAGER, 2003). Andererseits war der Filtereffekt der Anthocyane für das Monitoring im Lager unerheblich. Trotz der zu erwartenden Beeinflussung der Fluoreszenzspektren bedingt durch die Reabsorptionseffekte der erhöhten Anthocyangehalte in der roten Fruchtschale, konnten mit Hilfe der *PCA* die gleichen Veränderungen ermittelt werden, wie auf der grünen Seite der Äpfel.

Die erhöhte Streuung der Fluoreszenzspektren zum Zeitpunkt der Einlagerung kann durch die ausgeprägte Varianz in der Reifestufe von frisch geernteten Früchten erklärt werden. Während der Lagerung gehen die Früchte dann in eine langanhaltende Phase gleichbleibender Reife über, so dass sie sich zu einem Zeitpunkt alle in einem ähnlichen Reifestadium befinden (HERTOG, 2004). Nach zwei Monaten konnte demzufolge in beiden Lagervarianten eine Abnahme der Varianz im Datensatz mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie festgestellt werden (Abb. 4.2.9, 4.2.12, 4.2.14 und 4.2.15). Mit zunehmender Lagerungsdauer treten die Früchte aus dieser Ruhephase aus und es setzen verstärkt Seneszenzreaktionen ein. Die erneute Zunahme der Varianz im Datensatz ist in den Abb. 4.2.14 und 4.2.15 am Beispiel der Kühlagerung dargestellt (TJUSKINS und DE JAGER, 1999; HERTOG, 2004; HERTOG et al., 2005).

Lagerung von Möhren

Die kommerzielle Lagerung von Möhren erfolgt als Kühlagerung bei 0°C bis 4°C (KRUG et al., 2002). Bei höheren Temperaturen und ggf. einhergehend verminderter relativer Luftfeuchte tritt neben einem erheblichen Wasserverlust vor allem verstärkter Abbau der enthaltenen Carotinoide ein (LEE, 1986; DESOBRY et al., 1998). Die dargestellten Ergebnisse zeigen dementsprechend eine deutliche Verschiebung der bei Raumtemperatur gelagerten Möhren im Datenraum, hingegen unterschieden sich die Punktwolken der Lagervarianten mit 0°C oder 4°C kaum. Die Intensitätszunahme der Fluoreszenz im blau-grünen Wellenlängenbereich bei erhöhter Temperatur ist durch den vermindernden Reabsorptionseffekt der abnehmenden Carotinoid-Gehalte zu erklären (WULF et al., 2004). Die *Loadings* zeigen, dass *PC2* zusätzlich die Varianz von Veränderungen im Wellenlängenbereich um 550 nm abdeckt, indem das in den Möhren enthaltene Riboflavin fluoresziert (Abb. 4.2.18). Es wird angenommen, dass dieses Vitamin *B* während der Lagerung abgebaut wird. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse wurde demnach die Veränderungen des in wesentlich geringeren Gehalten vorkommenden Vitamin *B* im Vergleich zu den Carotinoiden (TREADWELL und METZLER, 1972; HERRMANN, 2001) in die Datenauswertung mit einbezogen.

5.1.3 Schlussfolgerung

Der aus der Absorptionsspektroskopie stammende Ansatz, mit Hilfe der Ableitungen einzelne *Peaks* in den Fluoreszenzspektren sichtbar machen zu können, konnte für die Fluoreszenzspektroskopie an intakten gartenbaulichen Produkten im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse (*PCA*) nicht bestätigt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und der *PCA* als Methode der Datenauswertung ist es jedoch möglich, Veränderungen von Gartenbauprodukten im Lager zu erfassen. Der Einsatz der Hauptkomponentenanalyse erscheint jedoch weniger angebracht für die Erarbeitung allgemeingültiger Lagerungs-Modelle, da spezifische Produktveränderungen von der Vielzahl komplexer kaum reproduzierbarer Veränderungen überdeckt werden. Zur Interpretation von einzelnen Datensätzen ist die Methode hingegen geeignet.

Die *Loadings* der Hauptkomponentenanalyse lassen bereits erste Schlüsse auf die Veränderungen einzelner Fruchtinhaltsstoffe zu. Für die Qualitätsbestimmung von Gartenbauprodukten ist eine quantitative Inhaltsstoffbestimmung eine notwendige Voraussetzung. Die bereits erwähnten Reabsorptions- und Löschungseffekte bestimmter Fruchtpigmente (z.B. Carotinoide, Chlorophylle, Anthocyane) auf die Eigenfluoreszenz weiterer Fruchtinhaltsstoffe (z.B. Phenole) sind dabei in der quantitativen Auswertung einzelner Inhaltsstoffe zu berücksichtigen.

5.2 Quantitative Fluoreszenzanalyse

Das mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie aufgezeichnete Fluoreszenzspektrum besteht aus der Summe der Einzelspektren aller in Lösung bzw. in den Früchten enthaltenen fluoreszierenden Moleküle. Aber auch Reabsorptions- und Löschungeffekte beeinflussen das Fluoreszenzspektrum und führen zu Veränderungen in Lage und Intensität der substanzspezifischen Fluoreszenzmaxima. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch physiologische Reaktionen in den Gartenbauprodukten bedingten qualitativen und quantitativen Veränderungen der Inhaltsstoffe während der Lagerung die Fluoreszenzspektren beeinflussen. Anhand von in Äpfeln und Erdbeeren enthaltenen phenolischen Verbindungen (HERRMANN, 2001) konnten zudem in Lösungen von Phenolstandards und Fruchtextrakten Wechselwirkungen der Produktinhaltsstoffe und der messbaren Fluoreszenz gezeigt werden (Abb. 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5) (WULF et al., 2005). Neben dem in Lösungen von Reinstsubstanzen nachgewiesenen wechselseitigen Einfluss der einzelnen Phenole auf das Fluoreszenzsignal ist bei der *in vivo* Analyse am lebenden Produkt jedoch von einer größeren Anzahl auf das System einwirkender Faktoren auszugehen, die eine quantitative Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe erschweren. Dabei können autofluoreszierende Produkte durch Reabsorptions- und Überlagerungseffekte das Fluoreszenzsignal der zu untersuchenden Moleküle stören. Zudem können aber auch nichtfluoreszierende Inhaltsstoffe die emittierte Fluoreszenz reabsorbieren. Eine Möglichkeit diese Effekte zu berücksichtigen ist es, Reflexionsmessung zur Korrektur des Fluoreszenzsignals einzusetzen, wie dies bereits in einigen Arbeitsgruppen erfolgreich untersucht wurde (GITELSON et al., 1998; LÖHMANNSRÖBEN und SCHÖBER, 1999; RAMOS und LAGORIO, 2004). Um den Einfluss von Reabsorptionseffekten auf die Fluoreszenzanalyse zu prüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit Verbräunungsreaktionen an geschnittenen Äpfeln untersucht. An dem sichtbar verbräunenden Fruchtgewebe wurden parallel zu den Fluoreszenzspektren Reflektionsspektren an derselben Gewebepartie aufgezeichnet.

5.2.1 Verbräunungsreaktionen

Die Daten zur Verbräunungsrate am Apfel zeigen, dass eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität im blau-grünen Wellenlängenbereich stattfindet (Abb. 4.3.7). Dies ist nur teilweise durch eine tatsächliche Abnahme der fluoreszierenden Inhaltsstoffe bedingt (Tab. 4.3.4). Durch die Akkumulation polymerisierter phenolischer Verbindungen finden Veränderungen der Absorptionseigenschaften an der Schnittfläche statt, die als Verbräunung sichtbar werden. Sie sind auf eine sehr breite Absorption im Bereich von 400 nm bis 550 nm zurückzuführen. In diesem Wellenlängenbereich kommt es zu einer Reabsorption der emittierten Strahlung. Berücksichtigt man diese Reabsorptionseffekte in der Fluoreszenzanalyse, wird deutlich, dass es nach dem Schnitt nur zu geringen Veränderungen der im blau-grünen Wellenlängenbereich auf die Fluoreszenz einwirkenden Moleküle kommt. In erster Linie tritt hingegen nach dem Schneiden des Apfels eine Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz im roten Wellenlängenbereich ein (SANDERS et al., 2005). Die blau-grüne Fluoreszenz wird zum einen bedingt durch einen Abbau von phenolischen Molekülen, die als Substrat für die Polyphenoloxdase (*PPO*) dienen. Die *PPO* haben dabei eine Affinität gegenüber den Hydroxyzimtsäuren wie z.B. der Chlorogensäure in Äpfeln. Es ist jedoch zu beachten, dass geringe Unterschiede in der Struktur den Reaktionsgrad des Substrates mit der *PPO* bestimmen

(CORSE, 1964). SHANNON und PRATT (1967) zeigten, dass in Äpfeln Dihydroquercetin als Substrat von der Polyphenoloxidase verwendet wird, nicht aber Quercetin. Auf der anderen Seite haben die neu gebildeten phenolischen Stoffe (z.B. *o*-Quinone) ebenfalls einen Einfluss auf das Spektrum im Bereich von 400 nm bis 550 nm (MURATA et al., 1995; NICOLAS et al., 1994). Es ist anzunehmen, dass das sich einstellende Gleichgewicht zwischen dem Abbau und der Bildung phenolischer Substanzen die Ursache für die nur geringe Veränderung in der Fluoreszenzemission darstellt.

5.2.2 Kalibrierung

Die Interaktionen der Fruchtinhaltsstoffe führen zu Reabsorptions- und Fluoreszenzlöschungseffekten, die das Fluoreszenzsignal erheblich beeinflussen. Diese Einflussfaktoren müssen in der quantitativen Fluoreszenzanalyse berücksichtigt werden. Bei den hohen Gehalten an Fruchtpigmenten (z.B. Carotinoide, Chlorophylle, Anthocyane) in Apfel und Erdbeere, die in breiten Wellenlängenbereichen absorbieren, ist eine Beeinträchtigung des messbaren Fluoreszenzsignals anzunehmen. Die Reabsorptions- und Fluoreszenzlöschungseffekte auf die Fluoreszenz einzelner Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse wurden jedoch bislang nicht detailliert untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kalibriermodelle zur zerstörungsfreien Bestimmung von Fruchtpolyphenolen an Apfel und Erdbeeren erarbeitet. Dafür wurden parallel zu den Fruchtfluoreszenzspektren mit Hilfe der Hochdrucksflüssigkeits-Chromatographie (*HPLC*) die Phenolgehalte der Früchte gemessen. Um die mittels *HPLC*-Analysen an den Äpfeln bei einer *UV*-Detektion von 325 nm gemessenen einzelnen Substanzen bestimmen zu können, wurden Standards gemessen und sowohl deren Retentionszeiten als auch deren Absorptionsspektren mit denen der Apfelproben verglichen. Die Standards sind meist Aglykone, während in der Frucht selbst selten die reinen Formen sondern meist an Zucker gebundene Derivate (Glykoside) vorkommen (TREUTTER, 2001). Diese weisen in der Regel ein dem Aglykon ähnliches Absorptionsspektrum auf, können aber, je nachdem ob sie in *trans*- oder in *cis*-Form vorliegen, doch unterschiedliche Absorptionseigenschaften aufzeigen. Zudem werden die Glykoside meist zu etwas früheren Retentionszeit detektiert (RÖMMELT, 2002; RÜHMANN, 2005). Da die Absorptionsspektren von Kaffeesäure denen anderer Hydroxyzimtsäuren wie bspw. Chlorogensäure sehr ähnlich sehen, wurde dieser Inhaltsstoff in der vorliegenden Arbeit als Hydroxyzimtsäurederivat bezeichnet. Es wird angenommen, dass es sich um ein Chlorogen- bzw. Kaffeesäurederivat handelt. Bei der Erdbeere konnte die Hydroxyzimtsäure hingegen als *p*-Cumaroyl-Glucose identifiziert werden.

Für die Kalibriermodelle wurde die etablierte Methode der *partial least squares* (*PLS*) Regressionsanalyse zur Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe am Beispiel zerstörungsfrei gemessener Fluoreszenzspektren und chromatographisch ermittelter Phenolgehalte von Apfel und Erdbeere eingesetzt. Dieses mathematische Verfahren wurde bereits vielfach in der Absorptions- bzw. Reflexionsspektroskopie an Pflanzen wie z.B. an Weizen (JARMER et al., 2003) und an intakten Früchten wie z.B. Äpfeln (LAMMERTYN et al., 2000; PEIRS et al., 2000; PEIRS, 2002) und in letzter Zeit auch in der Fluoreszenzspektroskopie an verarbeiteten

Produkten wie z.B. Olivenöl (CHEICKHOUSMANN et al., 2005) erfolgreich angewendet. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit mathematische Datenvorverarbeitungsmethoden erprobt, um die komplexen Zusammenhänge der zerstörungsfreien Fluoreszenzspektroskopie in gartenbaulichen Produkten in die Kalibrierung einbauen zu können.

Bei der *partial least squares* Regressionsanalyse handelt es sich um eine lineare Regression. Die möglicherweise in den Datensätzen auftretenden Nichtlinearitäten können dabei als systematische Fehler in das Modell einfließen. Die *PLS* Regression ist jedoch im Vergleich zu nichtlinearen Verfahren wie bspw. den Neuronalen Netzwerken (*artificial neuronal networks, ANN*) schneller und liefert akkurate Modelle für die Inhaltsstoffanalyse gartenbaulicher Produkte mittels zerstörungsfreier optischer Methoden (GELADI et al., 1996; DARDENNE et al., 2000; ESTIENNE et al., 2004), die durch Anwendung von *ANN* in verschiedenen Versuchsreihen nicht verbessert werden können (MILLER und ZUDE, 2004).

Auf dem für den Apfel ausgewählten Beispieldatensatz des Hydroxyzimtsäurederivats und für Erdbeeren anhand des Gehalts von p-Cumaroyl-Glucose wurden verschiedene Signal- und Datenvorverarbeitungsmethoden auf Reinspektren angewendet. Eine geeignete Vorverarbeitung sollte zu einer Verbesserung der Kalibrierung durch eine Erhöhung des Bestimmtheitsmaßes (r^2_c) und eine gleichzeitige Reduktion des Fehlers in der Kreuzvalidierung ($rmsecv$) beitragen. Um die optimale Anzahl latenter Variablen (*LV*) für die Kalibriermodelle zu ermitteln, wurde die Kreuzvalidierung auf zusammenhängenden Blöcken angewendet. Dabei gab es bei den relativ kleinen Datensätzen ($n = 43$ bzw. $n = 32$) keine auffälligen Unterschiede in den Modellen durch die Auswahl der Blockgröße. Die Nutzung von Blöcken als Kalibrier-Datensätze und Test-Datensätze wurde vorgezogen, da sie Verschiebungen im Datensatz wie bspw. einen Temperaturanstieg während der Messung berücksichtigt. Somit erliegen die Modelle weniger der Gefahr des *overfittings*. Die *leave-one-out* Methode, die jeweils jede Probe (i) einzeln auf den Rest der Datenmatrix ($X-i$) testet ist hingegen besonders anfällig für *overfitting* (CAMO, 2001).

Bei den Signalvorverarbeitungsmethoden führte die Autoskalierung über die Proben ($AUTO_P$) sowohl in den Apfel- als auch bei den Erdbeerfluoreszenzspektren zu den besten Ergebnissen mit hohen Bestimmtheitsmaßen der Kalibrierung und gleichzeitig geringen Fehlern in der Kreuzvalidierung (Tab. 4.4.1) (WULF et al., 2006). Der Ansatz durch die Signalvorverarbeitung mit der Mittelwertzentrierung über die Proben (MZ_P) die Wertigkeit in den Variablen (Wellenlängen) beizubehalten scheint sich jedoch in der Kalibrierung negativ auszuwirken, was in den erhöhten Fehlern in der Kreuzvalidierung zu erkennen ist. Bei *PLS* werden zur Berechnung der Kalibriermodelle nicht nur die Fluoreszenzspektren (mit einer möglichst großen Varianz), sondern auch die Phenolgehalte (mit einer maximierten Kovarianz zur spektralen Datenmatrix) mit einbezogen. Eine Ursache für die geringeren $rmsecv$ -Werte in den Kalibriermodellen nach $AUTO_P$ könnte sein, dass die Wertigkeit der Wellenlängen durch Informationen in den Fluoreszenzspektren überlagert wird, die nicht für den zu bestimmen Phenolgehalt relevant sind. Bei den Äpfeln wird die Fluoreszenzintensität entlang der Wellenlängen bei den Rohdaten durch die Unterschiede der Sonnen-

und der Schattenseite der Früchte bestimmt (MAY und TAUSCHER, 1998). Die Wertigkeiten in den Wellenlänge, die bei MZ_P beibehalten werden, basieren demnach vielmehr auf den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten bedingt durch die Messung auf der grünen und der roten Apfelschale als auf dem Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats. Durch das Angleichen der Wertigkeit der Variablen könnten die nicht relevanten Intensitätsunterschiede reduziert werden. Diese Hypothese wird bestätigt durch die besseren Ergebnisse der Kalibriermodelle auf den mit der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) vorverarbeiteten Fluoreszenzspektren (Tab. 4.4.7). Hier sind bei gleichem Bestimmtheitsmaß der Kalibrierung nach MZ_P die Fehler in der Kreuzvalidierung jeweils geringer als nach $AUTO_P$. Die Wellenlängenwertigkeit beizubehalten ist hierbei vorteilhafter, da die für den Gehalt der Hydroxyzimtsäure nichtrelevante Information bereits aus den Fluoreszenzspektren entfernt wurde.

Die Vor- und Nachteile der Vorverarbeitungsmethoden der Glättung und der Derivativspektroskopie wurden bereits im Zusammenhang der Auswertung der Lagerversuche vorgestellt.

Die Daten vorab mittels *PCA* auf wenige Faktoren zu reduzieren und somit höhere Bestimmtheitsmaße und geringere Fehler in der Kreuzvalidierung zu erhalten wird bei der Anwendung der Hauptkomponentenregression (*PCR*) angestrebt. Da die *partial least squares* Regressionsanalyse diesen Schritt der Datenvorverarbeitung bereits beinhaltet und sowohl die spektralen Daten als auch die Phenolgehalte von Beginn an in die Berechnung des Modells mit einbezogen werden, wurde auf die Auswertung mit Hilfe der *PCR* verzichtet.

Bei dem Kalibriermodell, das auf den Messungen an den Apfelfrüchten basiert, lag ein geringes Bestimmtheitsmaß ($r^2_c = 0,40$) vor. Dies erscheint plausibel, da nur ein geringer Anteil der Varianz im Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats (y) im Modell enthalten ist. Zudem deuten die *Loadings* des Kalibriermodells nach $AUTO_P$ auf eine Dominanz der Chlorophyllfluoreszenz im roten Wellenlängenbereich hin (Abb. 4.4.3). Das Kalibriermodell wurde demnach hauptsächlich auf der Varianz der Chlorophyllfluoreszenz aufgebaut. Die an Standardlösungen gemessenen Fluoreszenzspektren verschiedener Hydroxyzimtsäuren sowie Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (LICHTENTHALER et al., 1996; LANG et al., 1996; GOULAS et al., 1990; MORALES et al., 1996; LIAKOPOULOS ET AL., 2001; MEYER et al., 2002) zeigen jedoch eine Fluoreszenz im blau-grünen Wellenlängenbereich.

Im Vergleich dazu wurde bei den *Loadings* der auf den Erdbeerfluoreszenzspektren basierenden Kalibriermodelle und dem Hydroxyzimtsäuregehalt der p-Cumaroyl-Glucose keine Dominanz der Chlorophyllfluoreszenz festgestellt (Abb. 4.4.4). Da die Gewichtung der spektralen Variablen in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 650 nm liegt, sind die für die Hydroxyzimtsäuren charakteristischen blau-grünen Bereiche im Modell erfasst (MORALES et al., 1996; RÖMMELT, 2002).

Um den zuvor erwähnten dominanten Einfluss des Chlorophylls aus dem Kalibriermodell der Äpfel und ihres Gehalts an Hydroxyzimtsäurederivat auszuschließen, wurde der Wellenlängenbereich auf den für die Fluoreszenz der Chlorogen- bzw. Kaffeesäure charakteristischen Bereich eingekürzt. Die Nutzung eines reduzierten Wellenlängenbereichs zwischen 400 nm und 500 nm für die Kalibrierung führte weiterhin zu hohen Fehlern in der Kreuzvalidierung und geringem Bestimmtheitsmaß. Die schlechteren Ergebnisse beruhen vor allem auf den Unterschieden des Fluoreszenzsignals der grünen und der roten Seite der Frucht. In dem Modell können zwar über 90 % der Varianz in den Spektren erklärt werden, diese ist jedoch unabhängig von Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats (Tab. 4.4.6).

Eine geeignetere Methode der Wellenlängenselektion stellen die genetischen Algorithmen (*GA*) dar. Sie dienen dazu, weniger komplexe und vorhersagekräftigere Kalibriermodelle erarbeiten zu können, indem nur die für die Vorhersage eines bestimmten Parameters der Proben relevanten Wellenlängen herausgefiltert werden (LEARDI et al., 1992; LEARDI, 1994, 1996, 2000; JOUAN-RIMBAUD et al., 1995a, 1995b; LUCASIUS und KATEMAN, 1993; HIBBERT, 1993; YEE und COGHILL, 2002). Das ermöglicht eine auf bestimmten Wellenlängen eingeschränkte fluoreszenzspektroskopische Messung der Früchte und kann somit zu einer akzentuierteren und schnelleren Messung der Einzelproben in der Praxis beitragen. Mit Hilfe von *GA* ist es demnach möglich, statt geschlossener Wellenlängenbereiche einzelne, für das Kalibriermodell wesentliche Wellenlängen auszuwählen, und somit gezielt die spezifischen Inhaltsstoffe der gartenbaulichen Produkte in den Fluoreszenzspektren zu erfassen. Die erhöhten Bestimmtheitsmaße des Kalibriermodells und die geringeren *rmseccv*-Werte nach Wellenlängenselektion mit *GA* im Vergleich zu der reinen *PLS* Regression mit Autoskalierung lassen sich vor allem durch den höheren Anteil der Varianz des Phenolgehalts und der erhöhten Anzahl latenter Variablen ($n = 3$), die für die Kalibrierung verwendet wurden, erklären. Der neu ausgewählte Spektralbereich wurde dennoch zu stark in den roten Wellenlängen verlagert, so dass die Chlorophyllfluoreszenz in den Modellen nach wie vor dominierte. Im blau-grünen Wellenlängenbereich der Apfelfluoreszenzspektren wurden die für das Hydroxyzimtsäurederivat relevanten Informationen von der fruchtschalenbedingten Varianz der grünen und der roten Seite überlagert. (MAY und TAUSCHER, 1998). Bei den Erdbeeren zeigen die Ergebnisse der Wellenlängenselektion hingegen bereits einen Bezug zu dem für die Hydroxyzimtsäuren an Standards ermittelter charakteristischen blau-grünen Wellenlängenbereich.

Um die unerwünschte Varianz bedingt durch den erhöhten Anthocyangehalt in den Apfelfruchtschalen auf der Sonnenseite im Vergleich zu grünen Fruchtschale aus dem spektralen Datensatz zu entfernen, wurde die Methode der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) mit der von WESTERHUIS et al. (2001) vorgeschlagenen Anzahl von maximal zwei *DOSC*-Faktoren und einer Toleranz von 0,001 zur Berechnung der Pseudoinversen angewendet. Durch die Vorverarbeitung der Apfelfluoreszenzspektren mit *DOSC* konnte die Varianz, die durch die grüne und rote Seite der Apfelfrüchte bestimmt wurde, im Fluoreszenzsignal entfernt werden. Dass diese Information für den Gehalt an dem Hydroxyzimtsäurederivat in den Früchten nicht relevant ist, wird durch den Vergleich der Mittelwerte der Gehalte und deren Standardabweichungen deutlich, die sich auf der grünen und der roten Seite nicht wesentlich unterscheiden

(Tab. 4.4.6). Hingegen macht die Darstellung der anhand der Fluoreszenzspektren mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ermittelten *Scores*-Daten deutlich, dass das Fluoreszenzsignal auf beiden Seiten der Frucht erheblich unterschiedlich ist (Abb. 4.4.6). Diese Unterschiede sind demzufolge unabhängig vom Gehalt des Hydroxyzimtsäurederivats.

Bei den Erdbeeren führte der bereits visuell wahrnehmbare Unterschied des Anthocyangehalts der unterschiedlich reifen Früchte zu einer Überlagerung der Information der p-Cumaroyl-Glucose in den Fluoreszenzspektren. Die anthocyanbedingten Reabsorptionseffekte in den Fluoreszenzspektren konnten mit Hilfe von *DOSC* korrigiert werden und an den Gehalt der p-Cumaroyl-Glucose angepasst werden (Abb. 4.4.11, Tab. 4.4.8). Ähnliche Ergebnisse für die Anwendung der orthogonalen Signalkorrektur (*OSC*) im Vergleich zu anderen Vorverarbeitungsmethoden wurden auch in weiteren Arbeitsgruppen gefunden (QU et al., 2005).

Zur Überprüfung der Methode der direkten orthogonalen Signalkorrektur, wurden die *DOSC*-korrigierten Fruchtfluoreszenzspektren nochmals mit Hilfe der genetischen Algorithmen auf die für die Kalibriermodelle verwendeten Wellenlängen getestet. Es wurde deutlich, dass der Abzug der anthocyanbedingten Einflüsse auf die Apfelfluoreszenzspektren nach Wellenlängenselektion in dem für die Fluoreszenz der Chlorogen- bzw. Kaffeesäure charakteristischen spektralen Bereichs lag. Letztendlich wurde das Modell auf den blau-grünen Wellenlängenbereich konzentriert. Das beruht auf der Tatsache, dass, nachdem die störenden Einflüsse der spektralen Varianz der roten und grünen Seite der Früchte entfernt wurden, diese die relevanten Informationen für die Auswahl geeigneter Wellenlängen nicht mehr überlagerten. Die Ergebnisse wurden durch die Wellenlängenselektion auf den mit *DOSC* vorverarbeiteten Kalibriermodellen an den Erdbeeren bestätigt.

5.2.3 Validierung

Gartenbauliche Produkte zeichnen sich durch eine ausgeprägte Varianz in ihren Gehalten und ihrer Zusammensetzung von Inhaltsstoffe aus. Diese können sowohl durch pflanzenphysiologische Umbauprozesse während der Reifung als auch durch externe Einflüssen wie z.B. Klimabedingungen hervorgerufen werden. Für die Beurteilung der Qualität der Kalibriermodelle für den Einsatz der zerstörungsfreien Fluoreszenzanalyse von Obst und Gemüse in der Praxis ist es notwendig, die Modelle mit Hilfe eines unabhängigen neuen Datensatzes zu testen. Üblicherweise werden als Bewertungskriterien von Kalibrierungen auf der Basis von zerstörungsfreien Analysen das Bestimmtheitsmaß (r_c^2) und der Fehler in der Kreuzvalidierung herangezogen. Das heißt, es wird für die Validierung der erarbeiteten Kalibriermodelle ein zusammenhängender Probensatz in ein Kalibrier- und ein Test-Set aufgeteilt (WESTERHUIS et al., 2001). Nur wenige Studien haben für die Bewertung eine Erprobung an einem unabhängigen Datensatz durchgeführt (HERTOG et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die an Erdbeeren für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose erarbeiteten Modelle mit Hilfe von weiteren Früchten, die zu einem späteren Zeitpunkt in der Erntesaison gepflückt wurden, getestet. Um Aussagen über die Qualität eines Modells treffen zu können, wird der Fehler in der Validierung ($rmsep$) berechnet, der erklärt in wie weit das Kalibriermodell auf neue, unabhängige Datensätze angewendet werden kann (WISE und GALLAGHER, 1998; SUNDBERG, 1999; KOZAK und KOZAK, 2003). Dabei kann der Validierungsfehler nicht unabhängig von den Bestimmtheitsmaßen der Validierung (r_v^2) betrachtet werden, da geringe Korrelationen schlechten Kalibriermodellen entsprechen.

Die Modelle, die mit Hilfe der Signalvorverarbeitungsmethoden (hier am Beispiel von MZ_P und $AUTO_P$ dargestellt) erarbeitet wurden, zeigten bereits in der Kalibrierung geringere Bestimmtheitsmaße und höhere Fehler in der Kreuzvalidierung als die von *DOSC*-vorverarbeiteten spektralen Daten (Tab. 4.5.2 und 4.5.3). Mit Hilfe der Glättung, Derivativspektroskopie oder Normierung war es nicht möglich die Reabsorptionseffekte aus den Fluoreszenzspektren zu filtern. Erst nach Entfernung von zum Phenolgehalt orthogonal stehenden Informationen aus den spektralen Datensätzen nach der Methode der direkten orthogonalen Signalkorrektur von WESTERHUIS et al. (2001) konnten Kalibriermodelle mit hohen Bestimmtheitsmaßen in der Kalibrierung ($r_c^2 > 0,90$) und gleichzeitig geringen Fehlern in der Kreuzvalidierung ($rmsecv < 20\%$) errechnet werden. Die *Test-Set*-Validierung auf einem unabhängigen Datensatz bestätigte diese Ergebnisse. Für die auf *DOSC*-vorverarbeiteten Fluoreszenzspektren erarbeiteten Modelle konnten höhere r_v^2 -Werte und geringeren Fehler in der Validierung ermittelt werden. Ein Fehler der Validierung von über 50 % deutet jedoch darauf hin, dass auch mit Hilfe von *DOSC* nicht alle Variablen in den Fluoreszenzspektren erfasst werden konnten, die einen störenden Einfluss auf den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose haben.

Um eine Verminderung der störenden Einflüsse von Reabsorptionseffekten in der spektralen Datenmatrix zu erreichen, wurde im Folgenden untersucht, ob eine Korrektur der Fluoreszenzspektren mit Hilfe der parallel gemessenen Reflexionsspektren zu einer Verbesserung der Kalibriermodelle führt. Am Beispiel der Verbräunungsreaktion am geschnittenen Fruchtmaterial wurde bereits gezeigt, dass Reabsorptionseffekte das Fluoreszenzsignal beeinflussen. Es wurde erwartet, dass die im Anschluss durchgeführte direkte orthogonale Signalkorrektur zusätzlich weitere für den Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose unrelevante Informationen aus dem Fluoreszenzsignal entfernt. Das sollte zu verbesserten Kalibriermodellen mit geringeren Fehlern in der Validierung beitragen. Die Kalibriermodelle, die auf den reflexionskorrigierten Fluoreszenzspektren und anschließender Datenvorverarbeitung mit *DOSC* aufgebaut wurden, führten jedoch in der vorliegenden Arbeit zu sehr kleinen Bestimmtheitsmaßen ($r_c^2, r_v^2 < 0,26\%$) sowohl in der Kalibrierung als auch in der Validierung. Offensichtlich wird die in den Reflexionsspektren zusätzlich enthaltene Information, die nicht relevant ist für den zu bestimmenden Gehalt der p-Cumaroyl-Glucose, in die korrigierte spektrale Matrix aufgenommen. Das führt zu einer Verschlechterung der Kalibriermodelle.

5.2.4 Schlussfolgerungen

Früchte und Gemüseprodukte setzen sich aus einer Vielzahl von Inhaltsstoffen zusammen, die auf die Fluoreszenz einwirkenden können. Für die quantitative Bewertung einzelner Inhaltsstoffe von Gartenbauprodukten, müssen die in den messbaren Summenfluoreszenzspektren enthaltenen Reabsorptions- und Löschungseffekte berücksichtigt werden. Die von anderen Arbeitsgruppen untersuchte Fluoreszenzsignalkorrektur von Reabsorptionseffekten mit Hilfe von Reflexionsspektren wurde den komplexen Zusammenhängen in gartenbaulichen Produkten nicht gerecht. Mit Hilfe von multivariaten Auswertungsmethoden und insbesondere der neueren Datenvorverarbeitungsmethode der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) können einzelne phenolischen Inhaltsstoffe in der Komplexität der pflanzlichen Matrix hingegen in den Kalibriermodellen erfasst werden.

Die Qualität der Kalibriermodelle weist die auf unabhängigen Datensätzen erarbeiteten für gartenbauliche Produkte charakteristischen erhöhten Fehler in der Validierung auf. Um den Schwankungen in den Gehalten und der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in Früchten und Gemüseprodukten gerecht werden zu können, ist es daher notwendig, anhand von weiteren Versuchsreihen, die Kalibriermodelle anzupassen. Für das Prozessmanagement von Gartenbauprodukten stellt dieses Verfahren jedoch im Vergleich zu den bislang eingesetzten, aufwendigen und zerstörenden Analyseverfahren auf Stichproben eine geeignete Alternative dar.

6 Zusammenfassung

In gartenbaulichen Prozessen gewinnt das Produktmonitoring für das Qualitätsmanagement zunehmend an Bedeutung. Schnelle und zerstörungsfreie optische Methoden wie z.B. die Absorptionsspektroskopie wurden bereits in Sortieranlagen für Früchte eingesetzt. In verschiedenen Forschungsgruppen konnte zudem gezeigt werden, dass mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse physiologische Reaktionen und biochemische Veränderungen in den Pflanzen und Früchten erfasst werden können. In der vorliegenden Arbeit sollte darüber hinaus ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung ernährungsphysiologisch bedeutender sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, insbesondere nativer Fruchtpolyphenole, geleistet werden.

Zunächst erfolgten experimentelle Untersuchungen an Äpfeln und Möhren während der Lagerung. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse wurde die Varianz der spektralen Fluoreszenzsignale ausgewertet, um einen Trend in der Produktentwicklung sichtbar zu machen. Mit dem Ziel einer angepassten Methode der Datenauswertung wurden in diesem Zusammenhang verschiedene Signalvorverarbeitungsmethoden getestet. Für die Auswertung gelagerter Äpfel der Sorte 'Elstar' und Möhren der Sorte 'Bolero' zeigte die Hauptkomponentenanalyse auf den über die Proben mittelwertzentrierten spektralen Datensätzen eine deutliche Unterscheidung der Lagervarianten.

Die quantitative Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe ist jedoch in einer komplexen Matrix, wie sie ein pflanzliches Gewebe darstellt, erschwert. Ein Einfluss von Reabsorptions- und Löschungseffekten auf das Fluoreszenzsignal wurde auf der Basis von Phenolstandards untersucht und an Fruchtextrakten und geschnittenem Fruchtgewebe hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der zerstörungsfreien Messung untersucht. Darauf aufbauend wurden diese Ergebnisse und von anderen Arbeitsgruppen entwickelte neuere Datenvorverarbeitungsmethoden angewendet, um die Fluoreszenzspektroskopie für die quantitative Analyse im Fruchtgewebe nutzbar zu machen. Im mathematischen Ansatz wurden verschiedene Datenvorverarbeitungen getestet, während im empirischen Ansatz Reflexionsspektren parallel zu den Fluoreszenzemissionsspektren aufgezeichnet und zur Korrektur der variierenden Absorptionseigenschaften des Gewebes genutzt wurden.

Kalibriermodelle zur Polyphenolanalyse in Früchten wurden auf der Basis der zerstörungsfrei fluorimetrisch und chromatographisch ermittelten Werte an Äpfeln der Sorte 'Jonagold' und an Erdbeeren der Sorte 'Elsanta' erarbeitet und validiert. Die Datenvorverarbeitung mit Hilfe von genetischen Algorithmen (*GA*) und der direkten orthogonalen Signalkorrektur (*DOSC*) wurde zur Erstellung von Kalibriermodellen für die zerstörungsfreie Bestimmung des Fruchtgehalts an Hydroxyzimtsäurederivaten genutzt und hinsichtlich der Fehler in der Kalibrierung und Kreuzvalidierung verglichen.

In der Fluoreszenzanalyse übliche Verfahren der empirischen Korrektur mittels reflexionskorrigierten Fluoreszenzspektren führten nicht zu der erwarteten Fehlerverminderung. Die mit *DOSC* vorverarbeiteten Modelle zeigten bessere Ergebnisse in der Kalibrierung sowie in der Validierung auf einem unabhängigen Datensatz mit den für gartenbauliche Produkte mit hoher Variabilität häufig erhöhten Fehlern in der Validierung. Die für den Polyphenolgehalt nicht relevante Varianz in den Daten konnte mit Hilfe dieser mathematischen Datenvorverarbeitungsmethode aus den Fluoreszenzspektren herausgefiltert werden.

Der Einsatz chemometrischer Datenverarbeitung stellt folglich ein geeignetes Auswertungsverfahren zur Bestimmung von Polyphenolgehalten in Früchten dar. In zukünftigen Arbeiten sollen deshalb im Hinblick auf eine Optimierung der erarbeiteten Kalibriermodelle die Versuchsreihen fortgeführt werden.

Literatur

Abbott, J. A. (1999): Quality measurement of fruits and vegetables, *Postharvest Biology and Technology* (Band 15), Seite 207-225.

Abdi, H. (2003): Partial Least Squares (PLS) Regression, In: Lewis-Beck, M.; Bryman, A. und Futing, T. (Hrsg.): *Encyclopedia of Social Sciences Research Methods*, Sage, Thousand Oaks (CA).

Agati, G. (1998): Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength, *Pure and Applied Optics* (Band 7), Seite 797-807.

Ahvenainen, R. (1996): New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables, *Trends in Food Science & Technology* (Band 7), Seite 179-187.

Alaluf, A. (2001): Leiterplatteninspektion durch laserinduzierte Fluoreszenz, *SONDERDRUCK aus Leiterplatten* (Band 11), Seite 1-6.

Albani, J. R. (2001): Absorption et fluorescence. Principes et applications, *Techniques & Documentations*, Éditions TEC & DOC, Cachan Cedex (F).

Alexandrakis, M.; Singh, L.; Boucher, W.; Letourneau, R.; Theofilopoulos, P. und Theoharides, T. C. (1999): Differential effect of flavonoids on inhibition of secretion and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells, *International Journal of Immunopharmacology* (Band 21), Nr. 6, Seite 379-390.

Alexandropoulou, I.; Komaitis, M. und Kapsokafalou, M. (2005): Effects of iron, ascorbate, meat and casein on the antioxidant capacity of green tea under conditions of in vitro digestion, *Food Chemistry* (Band 94), Nr. 3, Seite 359-365.

Anderson, D. M.; Fredrickson, E. L.; Nachman, P.; Estell, R. E.; Havstad, K. M. und Murray, L. W. (1998): Laser-induced fluorescence (LIF) spectra of herbaceous and woody pre- and post-digested plant material, *Animal Feed Science Technology* (Band 70), Seite 315-337.

Andersson, C. A. (1999): Direct orthogonalization, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 47), Seite 51-63.

Arts, I.; Hollman, P.; Mesquita, H.; Feskens, E. und Kromhout, D. (2001): Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen Elderly Study, *International Journal of Cancer* (Band 92), Seite 298-302.

Awad, M. A.; de Jager, A. und Westing, L. (2000): Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation, *Scientia Horticulturae* (Band 83), Seite 249-263.

Awad, M. A. und de Jager, A. (2000): Flavonoid and chlorogenic acid concentration in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage, *Postharvest Biology and Technology* (Band 20), Seite 15-24.

Awad, M. A.; de Jager, A.; van der Plas, L. und van der Krol, A. (2001): Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of Elstar and Jonagold apples during development and ripening, *Scientia Horticulturae* (Band 90), Seite 69-83.

Awad, M. A. und de Jager, A. (2003): Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits, *Scientia Horticulturae* (Band 88), Nr. 4, Seite 289-298.

Awad, M. A.; Wagenmakers, P. S. und de Jager, A. (2001): Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples, *Scientia Postharvest Biology and Technology* (Band 27), Nr. 1, Seite 53-58.

Becker, W.; Billeb, G.; Eisenreich, N. und Klahn, T. (2004): Einsatz eines AOTF-Spektrometers für Anwendungen in der ultraschnellen Nahinfrarotspektroskopie, *Photonik* (Band 3), Seite 48-50.

Biran, A. I. und Breiner, M. (1999): *MATLAB 5 für Ingenieure: Systematische und praktische Einführung*, 3. Auflage, Addison-Wesley Verlag, München.

Birlouez-Aragon, I.; Sabat, P. und Gouti, N. (2002): A new method for discriminating milk heat treatment, *International Dairy Journal* (Band 12), Seite 59-67.

Bitsch, R.; Netzel, M.; Carlé, E.; Strass, G.; Kesenheimer, B.; Herbst, M. und Bitsch, I. (2000): Bioavailability of antioxidative compounds from Brettacher apple juice in humans, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (Band 1), Nr. 4, Seite 245-249.

Boyer, J. und Liu, R. H. (2004): Apple phytochemicals and their health benefits, *Nutrition Journal* (Band 3), Nr. 5, Seite 1-15.

Bright, F. V. und Munson, C. A. (2003): Time-resolved fluorescence spectroscopy for illuminating complex systems, *Photosynthesis Research* (Band 73), Seite 127-132.

Bro, R.; van den Berg, F.; Thybo, A.; Andersen, C. M.; Jorgensen, B. M. und Andersen, H. (2002): Multivariate data analysis as a tool in advanced quality monitoring in the food production chain, *Trends in Food Science & Technology* (Band 13), Seite 235-244.

Brody, S. S. (2002): Fluorescence lifetime, yield, energy transfer, and spectrum in photosynthesis, 1950-1960, *Analytica Chimica Acta* (Band 50), Seite 71-104.

Buschmann, C. und Grumbach, K. (1985): *Physiologie der Photosynthese*, Springer-Verlag, Heidelberg.

Buschmann, C.; Langsdorf, G. und Lichtenthaler, H. K. (2000): Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview, *Photosynthetica* (Band 38), Nr. 4, Seite 483-491.

Buschmann, C. und Lichtenthaler, H. K. (1998): Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging plants, *Journal of Plant Physiology* (Band 152), Seite 297-314.

Buschmann, P (2002): Der Stand der Flavonoidforschung zu Beginn des 21. Jahrhunderts (unter besonderer Berücksichtigung der Wirkungen und Wirksamkeiten der Flavonoide), Dissertation, Universität Graz.

Bünting, U. H. (1999): Auswertemethoden für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.

CAMO (2001): The Unscrambler – User Manual, © CAMO, USA.

Campiglia, A. D.; Hueber, D. M.; Moreau, F. und Vo-Dinh, T. (1997): Phosphorescence imaging system using an acousto-optical tunable filter and a charge-coupled device, *Analytica Chimica Acta* (Band 346), Seite 361-372.

Chappelle, E. W.; Wood, F. M., Jr.; McMurtrey, J. E., III und Newcomb, W. W. (1984): Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress as species differentiation, *Applied Optics* (Band 23), Nr. 1, Seite 134-138.

Cheikhousman, R.; Zude, M.; Bouveresse, D. J.; Rutledge, D. N. und Birlouez-Aragon, I. (2005): Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra olive oil during heating, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Band 382), Nr. 6, Seite 1438-1443.

Ciscato, M.; Sowinska, M.; vandeVen, M.; Heisel, F.; Deckers, T.; Bonany, J. und Valcke, R. (2001): Fluorescence imaging as a diagnostic tool to detect physiological disorders during storage of apples, *Acta Horticulturae* (Band 553), Seite 507-512.

Correale, C. E. und Marks, J. G. Jr. (2002): Contact dermatitis in a woodworker, *American Journal of Contact Dermatitis* (Band 13), Nr. 1, Seite 42-44.

Corse, J. (1964): The enzymatic browning of fruits and vegetables, In: Runeckles, V.C. (Hrsg.): Phenolics in normal and diseased fruits and vegetables, *Proceedings of the Plant Phenolics Group of North America Symposium*, Seite 41-62.

da Silva Porto, P.; Laranjinha, J. und de Freitas, V. (2003): Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships, *Biochemical Pharmacology* (Band 66), Seite 947-954.

Danckwortt, P. W. und Eisenbrand, J. (1964): *Lumineszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht*, 7. Auflage, Leipzig.

Dangl, J. L.; Dietrich, R. A. und Thomas, H. (2000): Senescence and programmed cell death, In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W. und Jones, R. L. (Hrsg.): Biochemistry & molecular biology of plants, American Society of Plant Biologists, Seite 1044-1100.

Dardenne, P.; Sinnaeve, G. und Baeten, V. (2000): Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: which method?, Journal of Near Infrared Spectroscopy (Band 8), Seite 229-237.

de Jong, S. (1993): SIMPLS: An alternative approach to partial least squares regression, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (Band 18), Nr. 3, Seite 251-263.

de Maesschalck, R.; Estienne, F.; Verdú-Andrés, J.; Candolfi, A.; Centner, V.; Despagne, F.; Jouan-Rimbaud, D.; Walczak, B.; Massart, D. L.; de Jong, S.; de Noord, O. E.; Puel, C. und Vandeginste, B. M. G. (1999): The development of calibration models for spectroscopic data using principal component regression, Internet Journal of Chemistry (Band 2).

DeEll, J. R.; Prange, R. und Murr, D. P. (1996): Chlorophyll fluorescence of Delicious apples at harvest as a potential predictor of superficial scald development during storage, Postharvest Biology and Technology (Band 9), Seite 1-6.

Desobry, S. A.; Netto, F. M. und Labuza, T. P. (1998): Preservation of beta-Carotene from Carrots, Critical Reviews in Food Science and Nutrition (Band 38), Nr. 5, Seite 381-396.

Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (2006): 5 am Tag, www.5amTag.de, Stand 10. Juli 2006.

Dragovic-Uzelac, V.; Pospišil, J.; Levaj, B. und Delonga, K. (2005): The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity, Food Chemistry (Band 91), Seite 373-383.

Eberhardt, M.; Lee, C. und Liu, R. H. (2002): Antioxidant activity of fresh apples, Nature (Band 405), Seite 903-904.

Escarpa, A. und Gonzalez, M. (1998): High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the performance of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of Chromatography A* (Band 823), Seite 331-337.

Estienne, F.; Despagne, F.; Walczak, B.; de Noord, O. E. und Massart, D. L. (2004): A comparison of multivariate calibration techniques applied to experimental NIR data sets. Part III: Robustness against instrumental perturbation conditions, *Chemometrics and Intelligent Systems* (Band 73), Nr. 2, Seite 207-218.

Fang, Y.-Z.; Yang, S. und Wu, G. (2002): Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition* (Band 18), Nr. 10, Seite 872-879.

Fearn, T. (2000): On orthogonal signal correction, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 50), Seite 47-52.

Feucht, W. und Treutter, D. (1989): *Phenolische Naturstoffe*, Obst- und Gartenbauverlag, München.

Fleschhut, J. (2004): Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen, Dissertation, Universität Karlsruhe.

Förster, T. (1951): *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen.

French, C. S.; Smith, J. H. C.; Virgin, H. I. und Airth, R. L. (1956): Fluorescence-spectrum curves of chlorophylls, pheophytins, phycoerythrins, phycocyanins and hypericin, *Journal of Plant Physiology* (Band 31), Nr. 5, Seite 369-374.

Friedrich, G.; Neumann, D. und Vogel, M. (1986): *Physiologie der Obstgehölze*, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin.

Froehlich, P. M. und Guilbault, G. G. (1990): Instrumentation for fluorescence, In: Guilbault, G. G. (Hrsg.): *Practical Fluorescence*, 2. Auflage, Dekker-Verlag, New York.

Frost, V. J. (2000): Kalibrationsoptimierung mittels genetischer Algorithmen. Eine Methode zur automatischen Selektion von PCR-Faktoren in der NIR-Spektrometrie, Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität-Duisburg.

Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Rhodes, M. J. C. und Johnson, I. T. (1998): Quercetin Glucosides Interact With the Intestinal Glucose Transport Pathway, *Free Radical Biology and Medicine* (Band 25), Nr. 1, Seite 19-25.

Geladi, P. (2002): Some recent trends in the calibration literature, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 60), Seite 211-224.

Geladi, P. und Kowalski, B. R. (1986): Partial least squares regression: a tutorial, *Analytica Chimica Acta* (Band 185), Seite 1-17.

Geladi, P.; Martens, H.; Hadjiiski, L. und Hopke, P. (1996): A calibration tutorial for spectral data. Part 2: Partial least squares regression using Matlab and some neural network results, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* (Band 4), Seite 243-255.

George, A. und Patonay, G. (1997): Fluorescence studies of carbocyanines using AOTF, *Talanta* (Band 45), Seite 285-289.

Gil, M. I.; Holcroft, D. M. und Kader, A. A. (1997): Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 45), Seite 1662-1667.

Gitelson, A. A.; Buschmann, C. und Lichtenthaler, H. K. (1998): Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements, *Journal of Plant Physiology* (Band 152), Seite 283-296.

Goulas, Y.; Moya, I. und Schmuck, G. (1990): Time-resolved spectroscopy of the blue fluorescence of spinach leaves, *Photosynthesis Research* (Band 25), Seite 299-307.

Green, G. L. und O'Haver, T. C. (1974): Derivative luminescence spectroscopy, *Analytical Chemistry* (Band 46), Nr. 14, Seite 2191-2196.

Guilbault, G. G. (1990): General Aspects of luminescence spectroscopy, In: Guilbault, G. G. (Hrsg.): Practical Fluorescence, 2. Auflage, Dekker-Verlag, New York.

Haaland, D. M. und Thomas, E. V. (1988): Partial least squares methods for spectral analysis. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, Analytical Chemistry (Band 60), Seite 1193-1202.

Häder, D.P. (2002): Photobiologie Vorlesung, www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/photobiologie/, Stand 10. Juli 2006.

Henning, W. (1981): Flavonolglykoside der Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*), Himbeeren (*Rubus idaeus* L) und Brombeeren (*Rubus fruticosus* L), Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung (Band 173), Seite 180-187.

Herpich, W. B. (2001): Chlorophyllfluoreszenzanalyse, eine einfache, schnelle und universelle Methode zur Bestimmung der Qualität gartenbaulicher Produkte, Tagungsband der 38. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, BDGL-Schriftenreihe (Band 19), Seite 158.

Herrmann, K. (2001): Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart.

Hertog, M.; Feskens, E.; Hollman, P.; Katan, M. und Kromhout, D. (1994): Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly study, Nutrition and Cancer (Band 22), Nr. 2, Seite 175-184.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Kromhout, D.; Hollman, P. C. H. und Katan, M. B. (1993): Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, The Lancet (Band 342), Nr. 8878, Seite 1007-1011.

Hertog, M. L. A. T. M. (2004): Quality change modelling in postharvest biology and technology, Dissertation, Katholieke Universiteit Leuven.

Hertog, M. L. A. T. M.; Lammertyn, J.; Desmet, M.; Scheerlinck, N. und Nicolaï, B. (2005): Incorporating biological variation in postharvest modelling, Acta Horticulturae (Band 682), Seite 843-850.

Hibbert, D. B. (1993): Genetic algorithms in chemistry, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 19), Seite 277-293.

Holcroft, D. M. und Kader, A. A. (1999): Carbon dioxide-induced changes in color and anthocyanin synthesis of stored strawberry fruit, *HortScience* (Band 34), Nr. 7, Seite 1244-1248.

Hollmann, P. C. H.; Hertog, M. G. L. und Katan, M. B. (1996): Analysis and health effects of flavonoids, *Food Chemistry* (Band 57), Nr. 1, Seite 43-46.

Hubbard, G. P.; Wolfram, S.; Lovegrove, J. A. und Gibbins, J. M. (2003): The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function, *Proceedings of the Nutrition Society* (Band 62), Nr. 29, Seite 469-478.

Inoue, Y. und Peñuelas, J. (2001): An AOTF-based hyperspectral imaging system for field use in ecophysiological and agricultural applications, *Remote Sensing* (Band 22), Nr. 18, Seite 3883-3888.

Jackson, J. E. (1981): Principal components and factor analysis: Part I – Principal components, *Journal of Quality Technology* (Band 12), Nr. 4, Seite 201-213.

Jarmer, T.; Kötz, B. und Atzberger, C. (2003): Spektroradiometrische Ableitung biophysikalischer Vegetationsparameter von Weizenbeständen: Vergleichende Untersuchung verschiedener empirisch-statistischer Verfahren, *Photogrammetrie-Fernerkundung-Geoinformation* (Band 1), Seite 43-50.

Jouan-Rimbaud, D.; Massart, D. L.; Leardi, R. und de Noord, O. E. (1995): Genetic algorithms as a tool for wavelength selection in multivariate calibration, *Analytical Chemistry* (Band 67), Seite 4295-4301.

Jouan-Rimbaud, D.; Walczak, B.; Massart, D. L.; Last, I. R. und Prebbe, K. A. (1995): Comparison of multivariate methods based on latent vectors and methods based on wavelength selection for the analysis of near-infrared spectroscopy data, *Analytica Chimica Acta* (Band 304), Seite 285-295.

Ju, Z.; Yuan, Y.; Liuo C. und Xin, S. (1995): Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple, *Scientia Horticulturae* (Band 61), Seite 215-226.

Kauer, C. und Kapoor, H. C. (2001): Review: Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health, *International Journal of Food Science and Technology* (Band 36), Seite 703-725.

Kautsky, H. und Hirsch, A. (1931): Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation, *Naturwissenschaften* (Band 19), Seite 964-964.

Kawano, S.; Watanabe, H. und Iwamoto, M. (1990): Measurement of sugar contents in intact peaches by NIRS, In: Iwamoto, M. und Kawano, S. (Hrsg.): *Proceedings of the 2nd International NIRS Conference*, Korin Publishing Co. Ltd., Tokyo, Seite 343-352.

Kim, M. S.; Chen, Y. R. und Mehl, P. M. (2001): Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging system for food quality and safety, *ASAE* (Band 44), Nr. 3, Seite 721-729.

Kim, M. S.; Lefcourt, A. M.; Chen, Y. R.; Kim, I.; Chan, D. E. und Chao, K. (2002): Multispectral detection of fecal contamination on apples based on hyperspectral imagery: Part II. Application of hyperspectral fluorescence imaging, *ASAE* (Band 45), Nr. 6, Seite 2039-2047.

Knee, M. (1988): Carotenol esters in developing apple fruits, *Phytochemistry* (Band 27), Nr. 4, Seite 1005-1009.

Knekt, P.; Isotupa, S.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Jarvinen, R.; Hakkinen, R.; Aromaa, A. und Reunanen, A. (2000): Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease, *European Journal of Clinical Nutrition* (Band 54), Seite 415-417.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Heliovaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E. und Aromaa, A. (1997): Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *American Journal of Epidemiology* (Band 146), Seite 223-230.

Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T. und Aromaa, A. (2002): Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *American Journal of Clinical Nutrition* (Band 76), Nr. 3, Seite 560-568.

Kondo, S.; Tsuda, K.; Muto, N. und Ueda, J. (2002): Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars, *Scientia Horticulturae* (Band 96), Nr. 1-4, Seite 177-185.

Kotani, M.; Matsumoto, M.; Fujita, A.; Higa, S.; Wang, W.; Suemura, M.; Kishimoto, T. und Tanaka, T. (2000): Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Band 106), Nr. 1, Seite 159-166.

Kozak, A. und Kozak, R. (2003): Does cross validation provide additional information in the evaluation of regression models?, *Ca.J.For.Res.* (Band 33), Seite 976-987.

Krause, G. H. und Weis, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis, the basics (Band 42), Seite 313-349.

Krug, H.; Liebig, H.-P. und Stützel, H. (2002): Gemüseproduktion, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart.

Kuczynski, A. P. (2003): Exploring reflectance spectra of apple slices and their relation to active phenolic compounds, *Pol.Journal of Food Nutrition Science* (Band 12), Nr. 53, Seite 151-158.

Lammertyn, J.; Peirs, A.; De Baeremaeker, J. und Nikolai, B. (2000): Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment, *Postharvest Biology and Technology* (Band 18), Seite 121-132.

Lang, M.; Lichtenthaler, H. K.; Sowinska, M.; Heisel, F. und Miehe, J. A. (1996): Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves, *Journal of Plant Physiology* (Band 148), Seite 613-621.

Laughton, M. J.; Evans, P. J.; Moroney, M. A.; Houlst, J. R. S. und Halliwell, B. (1991): Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives, *Biochemical Pharmacology* (Band 42), Nr. 9, Seite 1673-1681.

Le Marchand, L.; Murphy, S.; Hankin, J.; Wilkens, L. und Kolonel, L. (2000): Intake of flavonoids and lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute* (Band 92), Seite 154-160.

Leardi, R. (1994): Applications of a genetic algorithm to feature selection under full validation conditions and to outlier detection, *Journal of Chemometrics* (Band 8), Seite 65-79.

Leardi, R. (1996): Genetic algorithms in feature selection, Devillers, J., *Genetic Algorithms in Molecular Modeling*, Seite 67, Academic Press.

Leardi, R. (2000): Application of genetic algorithm-PLS for feature selection in spectral data sets, *Journal of Chemometrics* (Band 14), Seite 643-655.

Leardi, R.; Boggia, R. und Terrile, M. (1992): Genetic algorithms as a strategy for feature selection, *Journal of Chemometrics* (Band 6), Seite 267-281.

Leardi, R. und Lupiáñez, G. (1998): Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: how and when to use them, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 41), Seite 195-207.

Leardi, R.; Seasholtz, M. B. und Pell, R. J. (2002): Variable selection for multivariate calibration using a genetic algorithm, prediction of additive concentrations in polymer films from Fourier transform-infrared spectral data (Band 461), Seite 189-200.

Lee, C. Y. (1986): Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage, *Food Chemistry* (Band 20), Nr. 4, Seite 285-293.

Lee, J. C.; Kim, J.; Park, J. K.; Chung, G.H. und Jang, Y. S. (2003): The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis, *Experimental Cell Research* (Band 291), Nr. 2, Seite 386-397.

Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Park, J. K.; Kim, D. O. Lee H. J. und Lee, C. Y. (2003): Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 51), Seite 6516-6520.

Leichter Leben in Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH (2006): Leichter Leben in Deutschland, www.llid.de, Stand 10. Juli 2006.

Leja, M.; Mareczek, A. und Ben, J. (2003): Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage, *Food Chemistry* (Band 80), Nr. 3, Seite 303-307.

Liakopoulos, G.; Stavrianakou, S. und Karabourniotis, G. (2001): Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata, *Annals of Botany* (Band 87), Seite 641-648.

Lichtenthaler, H. K. (1996): Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants, *Journal of Plant Physiology* (Band 148), Seite 4-14.

Lichtenthaler, H. K. und Rinderle, U. (1988): The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Band 19), Nr. 1, Seite 29-85.

Lichtenthaler, H. K.; Lang, M.; Sowinska, M.; Heisel, F. und Miehe, J. A. (1996): Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system, *Journal of Plant Physiology* (Band 148), Seite 599-612.

Liu, R. H. (2000): Cancer – An apple a day helps keep the cancer away, *Nature* (Band 405), Seite 903-904.

Liu, R. H. (2002): Health benefits of dietary flavonoids: flavonols and flavones, *New York Fruit Quarterly* (Band 10), Nr. 3, Seite 21-23.

López-Ayerra, B.; Murcia, M. A. und Garcia-Armona, F. (1998): Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing, *Food Chemistry* (Band 61), Nr. 1-2, Seite 113-118.

Löhmansröben, H. G. und Schober, L. (1999): Combination of laser-induced fluorescence and diffuse-reflectance spectroscopy for the in situ analysis of Diesel-fuel-contaminated soils, *Applied Optics* (Band 38), Nr. 9, Seite 1404-1410.

Lucasius, C. B. und Kateman, G. (1993): Understanding and using genetic algorithms: Part I. Concepts, properties and context, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 19), Seite 1-33.

Lunkenbein, S. (2006): Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*), Dissertation, Technische Universität München.

Luypaert, J.; Heuerding, S.; de Jong, S. und Massart, D. L. (2002): An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a dermatological cream, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Band 30), Seite 453-466.

Lüdeker, W.; Dahn, H.-G.; Günther, K. P. und Schulz, H. (1999): Laser-induced fluorescence – A method to detect the vitality of scots pines, *Remote Sensing of Environment* (Band 68), Seite 225-236.

Macgregor, J. T. und Jurd, L. (1978): Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* (Band 54), Nr. 3, Seite 297-309.

Martens, H. und Naes, T. (1998): *Multivariate calibration*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Mastuda, H.; Morikawa, T.; Ueda, K.; Managi, H. und Yoshikawa, M. (2002): Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- and IL-4 production from RBL-2H3 cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (Band 10), Nr. 10, Seite 3123-3128.

Matile, P.; Hörtensteiner, S. und Thomas, H. (1999): Chlorophyll degradation, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (Band 50), Seite 67-95.

Matsuo, N.; Yamada, K.; Sohji, K.; Mori, M. und Sugano, M. (1997): Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship, *Allergy* (Band 52), Seite 58-64.

May, T. und Tauscher, B. (1998): Influence of ground colour and skin damage on fluorescence emitted by Braeburn apple fruit, *Acta Horticulturae* (Band 466), Seite 133-138.

Mayr, U.; Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Bauer, H. und Feucht, W. (1995): Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves, *Phytochemistry* (Band 38), Nr. 5, Seite 1151-1155.

Mayr, U.; Treutter, D. und Feucht, W. (1996): Phenolic compounds of apple fruit, *Erwerbsobstbau* (Band 38), Seite 8-12.

Mazza, G. (2002): Diet and human health: functional foods to reduce disease risks, *Acta Horticulturae* (Band 642), Seite 161-172.

Mazza, G. und Velioglu, Y. S. (1992): Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-fleshed apples, *Food Chemistry* (Band 43), Seite 113-117.

Merzlyak, M. N. und Chivkunova, O. B. (2000): Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* (Band 55), Nr. 2-3, Seite 155-163.

Merzlyak, M. N.; Solovchenko, A. E.; Smagin, A. I. und Gitelson, A. A. (2005): Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment, *Journal of Plant Physiology* (Band 162), Nr. 2, Seite 151-160.

Metz, G. (2002): Flavonoide Teil II. Trotz Resorptionsschwächen gut wirksam, *Pharmazeutische Zeitung online* (Band 27).

Meyer, A. S.; Heinonen, M. und Frankel, E. N. (1998): Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation, *Food Chemistry* (Band 61), Nr. 1-2, Seite 71-75.

Meyer, S.; Cartelat, A.; Moya, I. und Cerovic, Z. G. (2002): UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing, *Journal of Experimental Botany* (Band 54), Nr. 383, Seite 757-769.

Miller, W. M. und Zude, M. (2004): NIR-based sensing to identify soluble solids content of Florida citrus, *Applied Engineering in Agriculture* (Band 20), Seite 321-327.

Mole, S.; Rogler, J. C.; Morell, C. J. und Butler, L. G. (1990): Herbivore growth reduction by tannins: use of waldbauer ratio techniques and manipulation of salivary protein production to elucidate mechanisms of action, *Biochemical Systematics and Ecology* (Band 18), Nr. 2-3, Seite 183-197.

Morales, F.; Cerovic, Z. G. und Moya, I. (1994): Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L) leaves affected by iron deficiency, *Plant Physiology* (Band 106), Seite 127-133.

Morales, F.; Cerovic, Z. G. und Moya, I. (1996): Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophor of the epidermis, *Biochimica Biophysica Acta* (Band 1273), Seite 251-262.

Moshou, D.; Wahlen, S.; Strasser, R.; Schenk, A. und Ramon, H. (2003): Apple mealiness detection using fluorescence and self-organising maps, *Computers and Electronics in Agriculture* (Band 40), Seite 103-114.

Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguezk, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nuñez, J. M. und Parajo, J. C. (2001): Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry* (Band 72), Seite 145-171.

Murata, M.; Tsurutani, M.; Hagiwara, S.; Homma, S. und Kaneko, K. (1995): Relationship between apple ripening and browning: Changes in polyphenol content and polyphenol oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 43), Seite 1115-1121.

Nedbal, L.; Soukupová, J.; Whitmarsh, J. und Trtílek, M. (2000): Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality, *Photosynthetica* (Band 38), Nr. 4, Seite 571-579.

Nicolas, J. J.; Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Amiot, M. J. und Aubert, S. Y. (1997): Enzymatic browning reaction in apple and apple products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Band 34), Nr. 2, Seite 109-157.

Oliveira, E. J. und Watson, D. G. (2001): Chromatographic techniques for the determination of putative dietary anticancer compounds in biological fluids, *Journal of Chromatography B* (Band 764), Seite 3-25.

Otto, M. (1997): *Chemometrie – Statistik und Computereinsatz in der Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim.

Paganga, G. und Rice-Evans, C. A. (1997): The identification of flavonoids as glycosides in human plasma, *Federation of European Biochemical Societies Letters* (Band 401), Seite 78-82.

Peirs, A. (2002): Measurements of apple quality and maturity by means of NIR spectroscopy and imaging, *Dissertation*, Katholieke Universiteit Leuven.

Peirs, A.; Lammertyn, J.; Ooms, K. und Nikolai, B. (2000): Prediction of the optimal picking date of different apple cultivars by means of VIS/NIR-spectroscopy, *Postharvest Biology and Technology* (Band 21), Seite 189-199.

Perez-Ilzarbe, J.; Hernandez, T. und Estrella, I. (1991): Phenolic compounds in apples : varietal differences, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* (Band 192), Seite 551-554.

Perkins-Veazie, P. (1995): Growth and ripening of strawberry fruit, *Horticultural Reviews* (Band 17), Seite 267-297.

Peterson, J. und Dwyer, J. (1998): Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, *Nutrition Research* (Band 18), Nr. 12, Seite 1995-2018.

Podsadek, A.; Wilska-Jeska, J.; Anders, B. und Markowski, J. (2000): Compositional characterization of some apple varieties, *Europea Food Research Technology* (Band 210), Nr. 4, Seite 268-272.

Price, K. R.; Prosser, T.; Richetin, A. M. F. und Rhodes, M. J. C. (1999): A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing, *Food Chemistry* (Band 66), Nr. 4, Seite 489-494.

Qu, H.; Ou, D. und Cheng, Y. (2005): Background correction in near-infrared spectra of plant extracts by orthogonal signal correction, *Journal of Zhejiang University Science* (Band 6), Nr. 8, Seite 838-843.

Ramos, M. E. und Lagorio, M. G. (2004): True fluorescence spectra of leaves, *Photochemical and Photobiological Sciences* (Band 3), Seite 1063-1066.

Rechner, A. (2000): Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Reich, G. (2005): Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* (Band 57), Seite 1109-1143.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. und George Paganga, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science* (Band 2), Nr. 4, Seite 152-159.

Richter, G. (1997): Stoffwechselphysiologie der Pflanzen - Physiologie und Biochemie des Primärstoffwechsels und Sekundärstoffwechsels, 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.

Römmelt, S. (2002): Beteiligung phenolischer Verbindungen an der induzierten Resistenz von Apfel (*Malus domestica*) gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*), 1. Auflage, Shaker Verlag, Aachen.

Rühmann, S. (2005): Induktion von Sekundärstoffen in *Vitis vinifera* Kalluskulturen durch Hefe-Elicitoren, Dissertation, Technische Universität München.

Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K. und Lavee, S. (2002): Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L, *Scientia Horticulturae* (Band 92), Seite 147-176.

Sanders, A. Wulf J. Waales L. und Zude, M. (2005): Einfluss des Fruchtstadiums auf Verbräunungsreaktionen bei geschnittenen Äpfeln, Tagungsband der 42. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, BHGL-Schriftenreihe (Band 23), Seite 113.

Saranwong, S.; Sornsrivichai, J. und Kawano, S. (2004): Prediction of ripe-stage eating quality of mango fruit from its harvest quality measured nondestructively by near infrared spectroscopy, *Postharvest Biology and Technology* (Band 31), Seite 137-145.

Savitzky, A. und Golay, M. (1964): Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedures, *Analytical Chemistry* (Band 36), Seite 1627-1639.

Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Onom K. und Maeda, H. (1999): Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor promoter effect of vegetables, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (Band 47), Seite 397-402.

Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C. und Rémésy, C. (2002): Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomedicine & Pharmacotherapy* (Band 56), Nr. 6, Seite 276-282.

Schieber, A.; Stintzing, F. C. und Carle, R. (2001): By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments, *Trends in Food Science & Technology* (Band 12), Seite 401-413.

Schimmer, O.; Häfele, F. und Krüger, A. (1988): The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, *Mutation Research/Genetic Toxicology* (Band 206), Nr. 2, Seite 201-208.

Schuster, B. und Herrmann, K. (1985): Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits, *Phytochemistry* (Band 24), Seite 2761-2764.

Schwedt, G. (1981): *Fluoreszenzanalyse*, Verlag Chemie, Weinheim - Deerfield Beach (Florida) - Basel.

Shannon, C. T. und Pratt, D. E. (1967): Apple phenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds, *Journal of Food Science* (Band 32), Seite 479-483.

Sharaf, M. A.; Illman, D. L. und Kowalski, B. R. (1986): *Chemometrics*, John Wiley & Sons, New York.

Simon, P. W. (1997): Plant pigments for color and nutrition, HortScience (Band 32), Nr. 1, Seite 12-13.

Sjöblom, J.; Svensson, O.; Josefson, M.; Kullberg, H. und Wold, S. (1998): An evaluation of orthogonal signal correction applied calibration transfer of near infrared spectra, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (Band 44), Seite 229-244.

Stober, F. und Lichtenthaler, H. K. (1993): Studies on the localization and spectral characteristics of the fluorescence emission of differently pigmented wheat leaves, Bot.Acta (Band 106), Seite 365-370.

Stöhr, H. und Herrmann, K. (1975): Die phenolischen Inhaltsstoffe der Erdbeeren und deren Veränderungen während Wachstum und Reife der Früchte, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung (Band 158), Seite 341-348.

Sturm, U. (2005): Reichlich Obst, aber heftiger Preiserutsch, ZMP Der Markt – Obst und Gemüse (Band 32), Nr. 6, Seite 23-27.

Subhash, N.; Wenzel, O. und Lichtenthaler, H. (1999): Changes in blue-green and chlorophyll fluorescence emission and fluorescence ratios during senescence of tobacco plants, Remote Sensing of Environment (Band 69), Seite 215-223.

Sun, J.; Chu, Y. F.; Wu, X. und Liu, R. H. (2002): Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, Journal of Agriculture and Food Chemistry (Band 50), Nr. 25, Seite 7449-7454.

Sundberg, R. (1999): Multivariate calibration – direct and indirect regression methodology, Scandinavian Journal of Statistics (Band 26), Seite 161-207.

Takeuchi, A.; Saito, Y.; Kanoh, M.; Kawahara, T. D.; Nomura, A.; Ishizawa, H.; Matsuzawa, T. und Komatsu, K. (2002): Laser-induced fluorescence detection of plant and optimal harvest time of agricultural products (lettuce), Applied Engineering in Agriculture (Band 18), Nr. 3, Seite 128-133.

Terry, P.; Terry, J. B. und Wolk, A. (2001): Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update, Journal of Internal Medicine (Band 250), Seite 280-290.

Tijskens, L. M. M. und de Jager, A. (1999): Modelling the firmness of 'Elstar' apples during storage and transport, *Acta Horticulturae* (Band 485), Seite 363-371.

Törrönen, R. und Määttä, K. (2002): Bioactive substances and health benefits of strawberries, *Acta Horticulturae* (Band 567), Seite 797-803.

Treadwell, G. E. Jr. und Metzler, D. E. (1972): Development and application of methods for the study of free flavins in plant tissues, *Analytical Biochemistry* (Band 46), Nr. 1, Seite 261-275.

Treutter, D. (1989): Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamic aldehyde, *Journal of Chromatography* (Band 467), Seite 185-193.

Treutter, D. (2001): Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple, *Plant Growth Regulation* (Band 34), Seite 71-89.

Treutter, D.; Feucht, W. und Christ, E. (1991): Flavan-3-Ole und deren Einfluß auf die Pilzresistenz bei der Erdbeere, *Mitt.Klosterneuburg* (Band 41), Seite 79-83.

Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Gutmann, M. und Kolodziej, H. (1994): Identification of flavan-3-ols and pro-cyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection, *Journal of Chromatography* (Band 667), Seite 290-297.

Tsao, R.; Yang, R.; Young, J. C. und Zhu, H. (2003): Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 51), Seite 6347-6353.

van Boeckel, M. A. J. S. und Jongen, W. M. F. (1997): Product quality and food processing: how to quantify the healthiness of a product, *Cancer Letters* (Band 114), Seite 65-69.

van der Sluis, A.; Dekker, M.; de Jager, A. und Jongen, W. (2001): Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple, effect of cultivar, harvest year, and storage conditions (Band 49), Seite 3606-3613.

Veberic, R.; Trobec, M.; Herbinger, K.; Hofer, M.; Grill, D. und Stampar, F. (2005): Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Band 85), Seite 1687-1694.

Veraverbeke, E. (2001): Changes in epicular wax structure and composition in relation to moisture loss of apple during postharvest storage, Dissertation, Katholieke Universiteit Leuven.

Verstraeten, S. V.; Keen, C. L.; Schmitz, H. H.; Fraga, C. G. und Oteiza, P. I. (2003): Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure, *Free Radical Biology and Medicine* (Band 34), Nr. 1, Seite 84-92.

Vinson, J. A.; Su, X.; Zubik, L. und Bose, P. (2001): Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (Band 49), Nr. 11, Seite 5315-5321.

von Willert, D. J.; Matyssek, R. und Herppich, W. (1995): *Experimentelle Pflanzenökologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Wehry, E. L. (1990): Effects of molecular environment on fluorescence and phosphorescence, In: Guilbault, G. G. (Hrsg.): *Practical Fluorescence*, 2. Auflage, Dekker-Verlag, New York.

Wehry, E. L. (1990): Effects of molecular structure on fluorescence and phosphorescence, In: Guilbault, G. G. (Hrsg.): *Practical Fluorescence*, 2. Auflage, Dekker-Verlag, New York.

Westerhuis, J. A.; de Jong, S. und Smilde, A. K. (2001): Direct Orthogonal Signal Correction, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Band 56), Seite 13-25.

Williamson, G.; Day, A. J.; Plumbs, G. W. und Couteau, D. (2000): Human metabolic pathway of dietary flavonoids and cinnamates, *Biological Society Transactions* (Band 28), Nr. 2, Seite 16-22.

Wise, B. M. und Gallagher, N. B. (1998): *PLS_Toolbox 2.0 for use with MATLAB™*, Eigenvector Research, Inc., Manson.

Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R. und Shaver, J. M. (2003): PLS_Toolbox 3.0 for use with MATLAB™, © Eigenvector Research, Inc., Manson.

Wold, S. (1987): Principal component analysis, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (Band 2), Nr. 1-3, Seite 37-52.

Wold, S.; Antti, H.; Lingren, F. und Ohman, J. (1998): Orthogonal signal correction of near-infrared spectra, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (Band 44), Seite 175-185.

Wold, S.; Sjöström, M. und Eriksson, L. (2001): PLS-regression: a basic tool of chemometrics, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (Band 58), Nr. 2, Seite 109-130.

Wolfe, K. und Liu, R. H. (2002): Apple peels are rich in phytochemicals and have high antioxidant activity, New York Fruit Quarterly (Band 10), Nr. 3, Seite 9-11.

Wolfe, K.; Wu, X. und Liu, R. H. (2003): Antioxidant activity of apple peels, Journal of Agriculture and Food Chemistry (Band 51), Seite 609-614.

Wollgast, J. und Anklam, E. (2000): Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, Food Research International (Band 33), Seite 423-447.

Wrolstad, R. E. (2001): The possible health benefits of anthocyanin pigments and polyphenolics, The Linus Pauling Institute Newsletter, Seite 4-6.

Wuertenberger, E. (2005): Späte Erdbeersaison 2005, ZMP Der Markt – Obst und Gemüse (Band 32), Nr. 6, Seite 7-10.

Wulf, J.; Rutledge, D. N. und Zude, M. (2005): Einfluss der Zusammensetzung und des Gehalts an Polyphenolen auf die zerstörungsfreie Inhaltsstoffbestimmung im Apfel (*malus x domestica* Borkh.) mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie, Tagungsband der 42. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, BHGL-Schriftenreihe (Band 23), Seite 83.

Wulf, J. und Zude, M. (2003): Druckstellen an Äpfeln und Verbräunung von Obstsalaten: Analyse durch zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrometrie, *Landtechnik* (Band 58), Nr. 6, Seite 390-391.

Wulf, J. S.; Franck, C.; Nicolai, B. und Zude, M. (2006): Anpassung von Kalibriermodellen an das Fruchtmaterial mit Hilfe mathematischer Datenvorverarbeitungsmethoden am Beispiel der zerstörungsfreien fluorometrischen Polyphenolbestimmung, *Tagungsband der 43. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, BHGL-Schriftenreihe* (Band 24), Seite 138.

Wulf, J. S.; Herppich, W. B.; Linke, M. und Zude, M. (2003): Laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) – A non-destructive method to detect tissue response to wounding, *Acta Horticulturae* (Band 604), Seite 653-658.

Wulf, J. S.; Nicolai, B.; Geyer, M. und Zude, M. (2004): Non-destructive assessment of pigments in apple fruit and carrot by laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) measured at different time-gate positions, *Acta Horticulturae* (Band 682), Seite 1387-1399.

Yee, N. und Coghill, G. (2002): Orthogonal signal correction of potato crisp near infrared spectra, *Proceeding from 9th APCChE Congress and CHEMECA*, Seite 232-249.

Yoruk, R. und Marshall, M. R. (2003): Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review, *Journal of Food Biochemistry* (Band 27), Seite 361-422.

Zeaiter, M.; Roger, J. M. und Bellon-Maurel, V. (2005): Robustness of models developed by multivariate calibration, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (Band 24), Nr. 5, Seite 437-445.

Zhou, B.; Wu, L. M.; Yang, L. und Liu, Z. L. (2005): Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles, *Free Radical Biology and Medicine* (Band 38), Nr. 1, Seite 78-84.

Zhou, P.; Smith, N. L. und Lee, C. Y. (1993): Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 41), Seite 532-536.

Zude, M. (2003): Comparison of indices and multivariate models to non-destructively predict the fruit chlorophyll by means of visible spectrometry in apples, *Analytica Chimica Acta* (Band 481), Seite 119-126.

Zude, M. (2004): Detection of fruit tissue browning using laser-induced fluorescence spectroscopy, *Acta Horticulturae* (Band 628), Seite 85-91.

Zude, M.; Truppel, I. und Herold, B. (2002): An approach to non-destructive apple fruit chlorophyll determination, *Postharvest Biology and Technology* (Band 25), Nr. 2, Seite 123-133.

Danksagung

Diese Doktorarbeit ist in einer Zusammenarbeit des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim (ATB) e.V. und der Humboldt-Universität zu Berlin entstanden. An dieser Stelle möchte ich mich in erster Linie bei Frau Dr. habil. Manuela Zude für die intensive Betreuung, Diskussionsbereitschaft und die diversen Anregungen bedanken, die dieser Arbeit thematisch und inhaltlich den richtigen Schliff gegeben haben. Zudem bin ich ihr überaus dankbar, dass sie es mir ermöglicht hat, Erfahrungen an anderen, internationalen Instituten zu sammeln. Auch in Zeiten räumlicher Distanz war stets ein intensiver Austausch gegeben. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Uwe Schmidt für die Übernahme der Betreuung der Doktorarbeit und die hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Für die enge Zusammenarbeit mit der Firma IOM GmbH in Berlin möchte ich mich hier insbesondere bei Herrn Lutz Pfeifer und Herrn Karsten Stein bedanken, ohne deren Flexibilität und Einsatzbereitschaft auf geräte- und softwaretechnischer Ebene viele Messungen erschwert gewesen wären. Zudem gilt mein besonderer Dank Herrn Lutz Pfeifer für die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen und das Korrekturlesen von Teilen meiner Arbeit.

Für die Möglichkeiten, meine Ergebnisse zu vertiefen und mit anderen Methoden zu ergänzen möchte ich hier den Mitarbeitern der Institute danken, mit denen ich in dieser Zeit zusammenarbeiten durfte. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Bart Nicolai von der Katholieke Universiteit Leuven (KUL) in Belgien, Herrn Dr. Douglas Rutledge vom Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA P-G) in Paris und Herrn Prof. Dieter Treutter von der Technischen Universität München (TUM), Fachgebiet Obstbau in Freising. Darüber hinaus hatte ich viele helfende Hände und moralische Unterstützung von den dortigen Mitarbeitern und möchte mich hier besonders bei Christine Franck (KUL), Jurgen Schoetvaerts (KUL), Maarten Hertog (KUL), Lamia Ait A-meur (INA P-G), Rania Cheikhousman (INA P-G), Nawel Boudaoud (INA P-G), Susanne Rühmann (TUM) und Kerstin Zofka (TUM) bedanken. Für die Diskussionsbereitschaft, die Mithilfe bei den Messreihen und chemischen Analysen und die allgemein sehr angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich zudem bei all meinen Kollegen der Abteilung Technik im Gartenbau des ATB bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Geyer für die vielen Diskussionen zu den „galoppierenden Pferden“, Herrn Dr. Herppich für sein stets offenes Ohr und die Geduld beim Korrekturlesen meiner Arbeit und Frau Gabriele Wegner und Frau Corinna Rolleczeck für die Analysen im Labor und die gute Laune, die sie stets verbreitet haben.

Um eine Doktorarbeit zum Abschluss zu bringen, bedarf es jedoch nicht nur fachlicher Kompetenz, sondern in erster Linie der Unterstützung von Freunden und Familie. Ich danke meinen Eltern, dass sie stets an mich geglaubt haben und auch dafür, dass sie stolz auf mich sind. Meinen Freunden danke ich vor allem für ihre Geduld, mich durch die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit begleitet zu haben. Hier möchte ich zu allererst Christopher Hielscher-Tölzer nennen, der mich ans ATB gebracht und mir somit die Tore für diese Arbeit geöffnet hat. Julianne Gau danke ich für das sehr zügige Korrekturlesen meiner Arbeit über die „armen, gequälten Früchte“. Ohne Michael Müller wäre ich an der Formatierung der Texte und Abbildungen mit Sicherheit verzweifelt. Und *last but not least* möchte ich Fabian Landis für seine außerordentliche Geduld bei der Vorbereitung der Disputation danken und für die Begeisterung, die er meiner wissenschaftlichen Arbeit entgegen bringt.